



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Ferramentas para o controlo de formas larvares de
Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) na cidade
do Funchal**

Gonçalo Nuno da Costa Martins Alves

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

JULHO, 2014



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Ferramentas para o controlo de formas larvares de
Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) na cidade
do Funchal**

Autor: Gonçalo Nuno da Costa Martins Alves

Orientadora: Professora Doutora Carla A. Sousa (UEIPM/IHMT/UNL)

Coorientadora: Professora Doutora M. Teresa Novo (UEIPM/IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários  obtenção do grau de
Mestre em Parasitologia Médica

Apoio financeiro de: Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do Projeto
PTDC/SAU-EPI/115853/2009

*Aos meus Pais, Irmão, Avós
e a Ti... meu porto de abrigo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Carla Sousa, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste projeto, pela paciência e disponibilidade que demonstrou perante as minhas inúmeras incertezas e dúvidas, por todos os conhecimentos que me transmitiu na área da Entomologia Médica e Controlo Vetorial, área que a mim me era estranha, que de tão estranha se entranhou.

À minha coorientadora Teresa Novo, por todos os conhecimentos que me transmitiu, por todos os momentos de partilha e amizade, nos bons e nos não tão bons momentos e por toda a compreensão que demonstrou ao longo de todo o trabalho. Agradeço-lhe a si, Teresa, o “abre-olhos”, sem ele não estaria aqui.

Ao Gonçalo Seixas, companheiro de estadia na cidade do Funchal e mentor informal, sempre disponível para dar uma “mãozinha”, que me fez crescer e querer mais. Agradeço-te todo o apoio e todos os momentos de descontração e gargalhadas, cá e “lá longe”.

Ao IASAÚDE nas pessoas da Dr.^a Ana Nunes e Enfermeira Ana Clara Silva por permitir desenvolver este trabalho nos laboratórios de Saúde Pública.

À Dr.^a Maria Sofia Núncio e Dr.^a Maria João Alves, por permitirem o desenvolvimento de parte do trabalho experimental deste trabalho no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas (CEVDI).

Ao Doutor Hugo Osório e restantes membros do CEVDI o apoio no desenvolvimento dos ensaios necessários para a conclusão da Tese e por todos os momentos de reflexão que tivemos para desenvolvimento de uma unidade de Controlo de Vetores de expressão nacional.

Aos meus colegas da Unidade de Parasitologia Médica, Teresa, Zé, Vasco e Gonçalo. Obrigado pela amizade e apoio.

À Verónica Mixão e à Marta Oliveira por todos os momentos de descontração e desabafo. Obrigado.

Aos colegas do Mestrado em Parasitologia Médica, Hélder, Tiago, Mariana, José Cristóvão, José Vicente e Joana. Poucos mas enormes!

À Professora Doutora Maria Margarida Moncada, por ter despertado em mim um espírito crítico e de procura, que ainda em desenvolvimento, já dá frutos.

RESUMO

Aedes (Stegomyia) aegypti (L. 1762) é na atualidade um dos principais vetores de dengue, chikungunya e febre-amarela, além de importante agente de incomodidade. Desde o seu registo na ilha da Madeira, em Outubro de 2005, medidas de controlo vetorial direcionadas às formas adultas e imaturas, bem como campanhas de educação para a saúde visando a eliminação dos criadouros larvares, foram prontamente implementadas. Contudo, *Aedes aegypti* continuou a expandir-se, colonizando quase toda a costa sul da ilha até 2012. Nesse mesmo ano, foi registado o primeiro surto de dengue naquela região, com 2168 casos de doença. As dificuldades associadas ao controlo vetorial, devido à presença de elevados níveis de resistência a inseticidas na população local de *Aedes aegypti*, a colonização da costa sul da ilha e o surto de dengue pelo serotipo-1 (DENV-1), levaram as autoridades locais a procurar novas ferramentas de controlo. Assim, o objetivo proposto para este estudo foi caracterizar a população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal quanto à sua sensibilidade a substâncias presumivelmente larvicidas e avaliar se as mesmas levam a mudanças de comportamento das fêmeas na seleção de locais de postura, avaliando a sua relevância como futuras ferramentas de controlo larvar.

Nos resultados dos bioensaios de dose-resposta OMS observou-se que a população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal é suscetível ao sal de cozinha ($RR_{99}=1,08$) e ao *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*, na formulação Vectobac® G) ($RR_{99}=0,73$) e, aparentemente, tolerante ao espinosade (Spintor® 480 SC) ($\chi^2=22,90$; $P<0,05$). O regulador de crescimento de insetos piriproxifeno (PPF®, padrão analítico, Sigma-Aldrich) foi também avaliado, contudo, a suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* do Funchal a este composto não foi passível de ser confirmada, uma vez que não foi possível comparar a sua linha-de-base de resposta ao pupicida com a estirpe de referência Rockfeller. Porém, os resultados preliminares obtidos sugerem suscetibilidade ao PPF. Em relação aos ensaios de deteção de tratamento dos criadouros larvares por fêmeas grávidas, foram observadas diferenças significativas no número médio de ovos por fêmeas nos criadouros tratados com sal ($P<0,05$) que apresentaram sempre menor número de ovos. Para restantes produtos, espinosade, *Bti*, e piriproxifeno não foram detetadas diferenças significativamente estatísticas entre o número médio de ovos por fêmea nos criadouros tratados e controlo (água) ($P>0,05$).

Estes achados, embora preliminares, constituem um ponto de partida para futuros trabalhos de campo, que validarão a utilização destes produtos como possíveis ferramentas de controlo das formas larvares de *Aedes aegypti* na ilha da Madeira.

Palavras-chave: cidade do Funchal; *Aedes aegypti*; ferramentas de controlo; suscetibilidade a inseticidas; oviposição.

ABSTRACT

Aedes (Stegomyia) aegypti (L. 1762) is one of main vectors of dengue, chikungunya and yellow fever, as well as important nuisance agent. Since its first record in Madeira Island, in October 2005, vector control measures, aimed at adult and immature forms as well as health education campaigns for mosquito source reduction, were quickly implemented.

Nonetheless, *Aedes aegypti* thrived, colonizing almost all southern coast of the island until 2012. In that same year, an outbreak of dengue, with 2168 cases, was recorded in the region. The levels of insecticide resistance of the *Aedes aegypti* local population, the colonization of the southern coast of the island and the outbreak of dengue by serotype-1 (DENV-1), led the local authorities in the search for new vector control tools. Thus, the proposed goal for this study was to characterize the population of *Aedes aegypti* of Funchal regarding its susceptibility to substances with presumed larvicidal effect and assess whether the presence of these compounds in potential breeding sites may lead to changes in females' oviposition behavior.

The results of the dose-response WHO's bioassays showed that the population of *Aedes aegypti* of the city of Funchal is susceptible to salt ($RR_{99} = 1.08$) and *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti, Vectobac® G) ($RR_{99}=0.73$) and apparently tolerant to Spinosad (Spintor® 480 SC) ($\chi^2=22.90$, $P<0.05$). The effects of the insect growth regulator, pyriproxyfen (PPF®, analytical grade, Sigma-Aldrich) were also assessed. However, the susceptibility of the local *Aedes aegypti* population to this compound could not be verified since it was not possible to compare its base-line response with the one obtained for the reference strain, Rockefeller. Results suggest that *Aedes aegypti* from Funchal is susceptible to PPF. Regarding the effect of treated breeding sites in females' oviposition behavior, significant differences were observed in the mean number of eggs per female of salt-treated water containers ($P<0.05$) that presented reduced number of eggs. As to the other products, spinosad, Bti and pyriproxyfen, no significant differences ($P>0.05$) were observed between the average number of oviposited eggs/female between treated and control (water) breeding sites.

These findings, although preliminary, are a starting point for future field studies that may confirm and validate these products as possible tools for the control of larval forms of *Aedes aegypti* in Madeira Island.

Keywords: city of Funchal; *Aedes aegypti*; vector control tools; susceptibility to insecticides; oviposition.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762)	1
1.1.1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	5
1.1.2. Origem e distribuição mundial	6
1.1.1.1. <i>Aedes aegypti</i> na ilha da Madeira	8
1.1.3. Importância médica	9
1.1.3.1. Febre-amarela	9
1.1.3.2. Dengue	11
1.1.3.2.1. Surto de dengue na ilha da Madeira	12
1.1.3.3. Chikungunya	13
1.2. CONTROLO VETORIAL DE <i>Aedes aegypti</i>	14
1.2.3. Gestão ambiental	15
1.2.4. Controlo químico	17
1.2.4.1. Organoclorados	17
1.2.4.2. Organofosforados	18
1.2.4.3. Carbamatos	18
1.2.4.4. Piretróides	18
1.2.4.5. Reguladores do crescimento de insetos	19
1.2.5. Controlo biológico	21
1.2.5.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
1.2.5.1.1. Mecanismo de ação	23
1.2.5.1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie israelensis	24
1.2.5.2. Espinosade	25
1.2.5.2.1. Mecanismo de ação	26
1.2.6. Controlo genético	27
1.2.7. Controlo vetorial de <i>Aedes aegypti</i> na ilha da Madeira	28
1.3. MOSQUITOS E OS SEUS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS	28
1.3.3. Resistências associadas ao metabolismo dos inseticidas	29
1.3.3.1. Resistências associadas às citocromo P450	30
1.3.3.2. Resistências associadas às esterasas	30
1.3.3.3. Resistências associadas às glutatíon-S-transferases	31

1.3.3.4.	Resistências associadas às UDP-glicosiltransferases	31
1.3.4.	Resistências por alteração do local-alvo.....	31
1.3.4.1.	Resistências associada aos recetores nicotínicos da acetilcolina.....	31
1.3.4.2.	Resistências associadas à acetilcolinesterase	32
1.3.4.3.	Resistências associadas aos canais de sódio – resistências “knockdown” (kdr)	32
1.3.4.4.	Resistências associadas ao recetor do GABA.....	32
1.3.5.	Métodos para a deteção de resistências a inseticidas em larvas de mosquitos – Testes padronizados da OMS	33
1.3.6.	Resistências a inseticidas na população de <i>Aedes aegypti</i> na ilha da Madeira	35
2.	OBJETIVOS	36
2.1.	OBJETIVO GERAL	36
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1.	ILHA DA MADEIRA.....	38
3.2.	COLÓNIA DE MOSQUITOS	39
3.3.	INSETICIDAS E OUTROS COMPOSTOS.....	40
3.4.	BIOENSAIOS DE DOSE-RESPOSTA OMS	40
3.4.1.	Bioensaios dose-resposta de fase exploratória	41
3.4.2.	Bioensaios OMS de dose-resposta definitivos	42
3.4.2.1.	Perfil de suscetibilidade ao sal.....	42
3.4.2.2.	Perfil de suscetibilidade ao espinosade.....	42
3.4.2.3.	Perfil de suscetibilidade ao <i>Bti</i>	42
3.4.2.4.	Perfil de suscetibilidade ao piriproxifeno – ensaios preliminares	43
3.5.	ESTUDOS DE OVIPOSIÇÃO.....	44
3.6.	TRATAMENTO E ANÁLISE DE DADOS	45
4.	RESULTADOS	48
4.1.	BIOENSAIOS DOSE-RESPOSTA DE FASE EXPLORATÓRIA.....	48
4.2.	BIOENSAIOS DEFINITIVOS DOSE-RESPOSTA.....	49
4.2.1.	Perfil de suscetibilidade ao sal.....	50
4.2.2.	Perfil de suscetibilidade ao espinosade	52

4.2.3.	Perfil de suscetibilidade ao <i>Bti</i>	54
4.2.4.	Perfil de suscetibilidade ao piriproxifeno – Ensaios preliminares.....	56
4.3.	ESTUDOS DE OVIPOSIÇÃO.....	60
5.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	63
5.1.	UTILIZAÇÃO DE SAL COMO LARVICIDA PARA <i>Aedes aegypti</i> DA ILHA DA MADEIRA	64
5.2.	UTILIZAÇÃO DE ESPINOSADE (SPINTOR® 480 SC), COMO LARVICIDA PARA <i>Aedes aegypti</i> DA ILHA DA MADEIRA.....	66
5.3.	UTILIZAÇÃO DE BTI (VECTOBAC® G) COMO LARVICIDA PARA <i>Aedes aegypti</i> NA ILHA DA MADEIRA	67
5.4.	UTILIZAÇÃO DE PIRIPROXIFENO COMO LARVICIDA PARA <i>Aedes aegypti</i> NA ILHA DA MADEIRA	69
5.5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	ANEXOS.....	85
	ANEXO 1: PROBIT DOS ENSAIOS DE DR OMS POR BIOLARVICIDA E ESTIRPE DE MOSQUITO	86
	ANEXO 2: ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS ESTUDOS DE OVIPOSIÇÃO	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: (a) Esquema geral de uma fêmea de mosquitos (Família Culicidae) (Adaptado de Becker et al. 2003). Cabeça de culicídeo fêmea (b) e macho (c): a) antena pilosa, a1) antena plumosa, pr) probóscis, pa) palpos (Adaptado de Pereira Neves 2004).	2
Figura 2: Larvas de mosquito: a) Subfamília Culicinae e b) Subfamília Anophelinae (Adaptado de Marquardt et al. 2005).	2
Figura 3: Representação esquemática do probóscis da família Culicidae. Representação lateral (a) e corte transversal (b) do probóscis: lb, labro; md, mandíbulas; hf, hipofaringe; mx, maxilas; l, lábio; ca, canal alimentar. Posição do aparelho bucal durante a alimentação solenofágica (c): l, lábio retraído e restantes estruturas inseridas no capilar sanguíneo (Adaptado de Pereira Neves 2004).	3
Figura 4: <i>Aedes aegypti</i> adulto. (a) Vista geral do macho (fotografia do autor); (b) pormenor do tórax com duas linhas médias transversais e lateralmente um padrão semelhante a uma lira; (c) pormenor do abdómen com marcas brancas laterais e linhas brancas basais (Imagens B e C adaptadas de ECDC 2012).	4
Figura 5: (a) Representação esquemática do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . As posturas são realizadas no interior de recipientes, tipicamente criadouros artificiais. Quando estes se enchem de água, dos ovos eclodem larvas que passam por quatro estádios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4), pupas e destas emergem adultos (Adaptado de Nature Education 2011). (b) Posição adotada pela fêmea antes da postura (Adaptado de Chistophers 1960).	5
Figura 6: Limites tradicionais da distribuição de <i>Aedes aegypti</i> (Adaptado de Chistophers 1960).	7
Figura 7: Freguesias da cidade do Funchal onde foram capturados exemplares de <i>Aedes aegypti</i> , durante os primeiros inquéritos entomológicos, direcionados para esta espécie (Adaptado de Margarita et al. 2006).	8
Figura 8: Endemicidade da Febre-amarela na América Latina (a) e África (b) (Adaptado de Barnett 2007).	10
Figura 9: Expansão global dos serotipos de dengue: (a) 1970 e (b) 2011 (Adaptado de Gubler 2011).	12
Figura 10: Dispersão do CHIKV de África para o Oceano Índico e Europa nos últimos 50 anos. As diferentes linhagens evolutivas são identificadas usando setas de cores diferentes (Adaptado de Lamballerie et al. 2008).	14
Figura 11: Estrutura química do DDT (Diclorodifeniltricloroetano) (Adaptado de Becker et al. 2003). .	20
Figura 12: Estrutura química do organofosforado <i>temephos</i> (Adaptado de Becker et al. 2003).	20
Figura 13: Estrutura química do carbamato <i>Benciocarb</i> , utilizado amplamente como inseticida em pulverizações intradomiciliárias, devido ao seu efeito residual (Adaptado de Becker et al. 2003).	20
Figura 14: Estrutura química do piretróide permetrina, utilizado para impregnar redes mosquiteiras e outras peças de roupa (Adaptado de Becker et al. 2003).	21
Figura 15: Estrutura química do RCI piriproxi-feno (PPF) (Adaptado de Becker et al. 2003).	21

Figura 16: Mecanismo de ação do <i>Bt</i> em Lepidoptera: (1) ingestão do <i>Bt</i> ; (2) dissociação dos cristais; (3) ativação das toxinas (4) ligação das toxinas aos seus recetores (Cry) ou internalização na membrana (Cyt); (5) formação de poros e lise celular (Adaptado de Schünemann et al. 2014).	24
Figura 17: Estrutura química dos dois principais constituintes do espinosade: (a) espinosina A, componente maioritário e (b) espinosina D, componente minoritário (Adaptado de WHO 2007).....	26
Figura 18: Linhas de regressão características de uma população suscetível (A), com variações sazonais ou tolerância (B) e resistente (C) (Adaptado de WHO 1970).	34
Figura 19: Enquadramento geográfico do arquipélago da Madeira (Adaptado de Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2011).	38
Figura 20: Percentagem das mortalidades larvares observadas ao longo dos ensaios de dose-resposta OMS por exposição ao sal. (A) Ensaio dose-resposta com larvas EstRock. (B) Ensaio dose-resposta com larvas EstFx. (C) Comparação das mortalidades observadas nas estirpes.	51
Figura 21: Percentagem das mortalidades larvares observadas ao longo dos ensaios de dose-resposta OMS por exposição ao espinosade. (A) Ensaio dose-resposta com larvas EstRock. (B) Ensaio dose-resposta com larvas EstFx. (C) Comparação das mortalidades observadas nas estirpes.	53
Figura 22: Percentagem das mortalidades larvares observadas ao longo dos ensaios de dose-resposta OMS por exposição ao <i>Bti</i> . (A) Bioensaio dose-resposta com larvas EstRock. (B) Bioensaios dose-resposta com larvas EstFx. (C) Comparação das mortalidades observadas nas estirpes.	55
Figura 23: Efeito larvicidas (A), pupicida (B) e inibição da emergência de adultos (C), observado ao longo do ensaio de dose-resposta OMS por exposição de larvas de <i>Aedes aegypti</i> das estirpes Rock e Fx ao PPF.	58

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Posição taxonómica do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Adaptado de Marquardt et al. 2005).	1
Quadro 2: Concentrações de piriproxifeno seleccionadas para os ensaios de dose-resposta para as estirpes Rock e Fx e volume de etanol 96% utilizado para a produção dos controlos.	44
Tabela 1: Inseticidas utilizados nos estudos exploratórios para definição dos intervalos de atividade e seleção das concentrações que produzem mortalidades entre os 10 e 100%.	41
Tabela 2: Concentrações utilizadas para os ensaios de dose-resposta para as duas estirpes, o número de ensaios realizados por produto e a geração larvar da população do Funchal para a realização dos ensaios.	43
Tabela 3: Inseticidas utilizados nos testes de múltipla escolha para a determinação do efeito repelente ou de atração de inseticidas à oviposição.	45
Tabela 4: Resultados dos ensaios exploratórios para determinação do intervalo de ação do sal.	48
Tabela 5: Resultados dos ensaios exploratórios para determinação do intervalo de atividade do espinosade.	48
Tabela 6: Resultados dos ensaios exploratórios para a determinação do intervalo de ação do <i>Bti</i> .	49
Tabela 7: Total de larvas testadas nos ensaios DR OMS por produto e estirpe de <i>Aedes aegypti</i> .	49
Tabela 8: Resultado dos ensaios dose-resposta de sensibilidade larvar das estirpes Rockfeller e Funchal ao sal.	50
Tabela 9: Resultados dos ensaios dose-resposta de sensibilidade larvar das estirpes Rockfeller e Funchal ao espinosade.	52
Tabela 10: Resultados dos ensaios dose-resposta de sensibilidade larvar das estirpes Rockfeller e Funchal ao <i>Bti</i> .	54
Tabela 11: Resultados dos ensaios DR de suscetibilidade larvar aos efeitos da inibição de emergência do PPF sobre a estirpe Rockfeller.	56
Tabela 12: Resultados dos ensaios de suscetibilidade larvar aos efeitos da inibição de emergência do PPF sobre a estirpe Funchal.	57
Tabela 13: Resultados da análise do modelo <i>Probit</i> e Razão de Resistência, para as estirpes Rockfeller e Funchal, quanto aos efeitos larvicidas do sal, espinosade e <i>Bti</i> .	59
Tabela 14: Resultados da análise <i>Probit</i> e Razão de Resistência, para as duas estirpes Rockefeller e Funchal, quanto ao efeito na inibição da emergência provocado pelo PPF.	59
Tabela 15: Resultados do ensaio de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao sal sem papel de filtro.	61
Tabela 16: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao sal com papel de filtro.	61
Tabela 17: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao espinosade.	61

Tabela 18: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao <i>Bti</i> .	62
Tabela 19: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao piriproxifeno.	62

SIGLAS E ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHJ	Análogos das hormonas juvenis
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie <i>israelensis</i> , serotipo H14
CA	<i>corpus allatum</i>
CDC	Centre for Disease Prevention and Control
CHIKV	Vírus chikungunya
CIE ₅₀	Concentração de inibição de emergência 50%
CIE ₉₉	Concentração de inibição de emergência 99%
CL ₅₀	Concentração letal 50%
CL ₉₉	Concentração letal 99%
COE	Carboxilesterase
Cry	Proteínas cristal
Cyt	Proteínas citolíticas
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus da dengue
DGS	Direção Geral de Saúde
DRADR	Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural
E.	Ecdisona
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EstFx	Estirpe Funchal
EstRock	Estirpe Rockefeller
FA	Febre-amarela
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-R	Recetores do ácido gama-aminobutírico
GST	Glutatioão-S-Transferase
Hab.	Habitantes
HJ	Hormona Juvenil
IA	Ingrediente ativo
ICPs	<i>Insecticidal crystal proteins</i>
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INSA	Instituto Nacional de Saúde
<i>kdr</i>	Resistência <i>knockdown</i>
L.	Linnaeus
mtADN	ADN mitocondrial
nAChR	Recetores nicotínicos da acetilcolina
OC	Organoclorado
OP	Organofosforados

P450	Citocromo P450
PPF	Piriproxifeno
PY	Piretróide
RAM	Região Autónoma da Madeira
RCI	Reguladores do Crescimento de Insetos
RIDL	<i>Release of Insects Carrying a Dominant Lethal</i>
RR	Razão de Resistência
SIT	<i>Sterile Insect Technique</i>
TFP	Toxinas formadoras de poros
UDPGT	UDP-glicosiltransferase
UNL	Universidade Nova de Lisboa
US\$	Dólar americano

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Os mosquitos pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera e Família Culicidae (Quadro 1). Nesta família estão identificadas, aproximadamente, 3500 espécies divididas em três subfamílias: Toxorhynchitinae, Anophelinae e Culicinae (Marquardt et al. 2005; Capinera 2008). É nas últimas duas subfamílias que se encontram as espécies com importância médica e veterinária, já que as fêmeas são hematófagas. A distribuição dos mosquitos é praticamente global, com exceção do Continente da Antártica, habitando locais abaixo do nível do mar até aos 3000 metros de altitude (Marquardt et al. 2005; Capinera 2008).

Quadro 1: Posição taxonômica do mosquito *Aedes aegypti* (Adaptado de Marquardt et al. 2005).

Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Diptera
Subordem	Nematocera
Família	Culicidae
Subfamília	Culicinae
Gênero	<i>Aedes</i>
Espécie	<i>Aedes aegypti</i>

A família Culicidae (Figura 1: A) pode ser descrita morfologicamente, na fase adulta, como tendo um corpo delgado com 3 a 6 mm de comprimento, patas longas e finas, revestido por escamas que, formando manchas e padrões, são importantes para a identificação da espécie. Sendo nematóceros, as antenas são constituídas por 15 a 16 segmentos, que nas fêmeas são pilosas e nos machos são plumosas (Figura 1: B e C), característica que permite a diferenciação sexual (Pereira Neves 2004).

Na fase larvar, os mosquitos têm uma cabeça que pode variar na forma, desde oval a retangular dependendo do gênero, com antenas delgadas e cobertas por sedas. O aparelho bucal é constituído por sedas orais e pentes que filtram partículas em suspensão na água, ou adaptadas à predação na subfamília Toxorhynchitinae. O tórax é globoso, sempre mais largo que a cabeça e abdómen e coberto por sedas de dimensão e

ramificação variável. O abdômen é constituído por 10 segmentos, estando presentes no 8º as estruturas respiratórias que podem ser um sifão, nas subfamílias Culicinae e Toxorhynchitinae, ou espiráculos na subfamília Anophelinae (Capinera 2008; Marquardt et al. 2005).

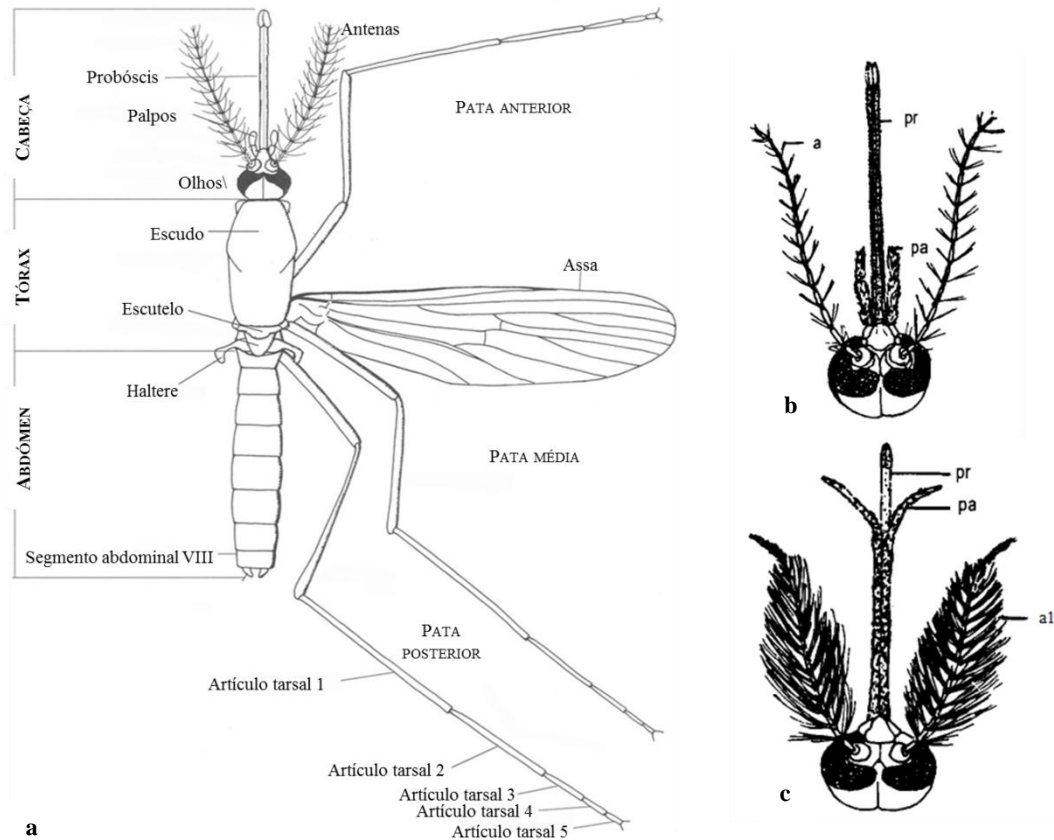


Figura 1: (a) Esquema geral de uma fêmea de mosquitos (Família Culicidae) (Adaptado de Becker et al. 2003). Cabeça de culicídeo fêmea (b) e macho (c): a) antena pilosa, a1) antena plumosa, pr) probóscis, pa) palpos (Adaptado de Pereira Neves 2004).

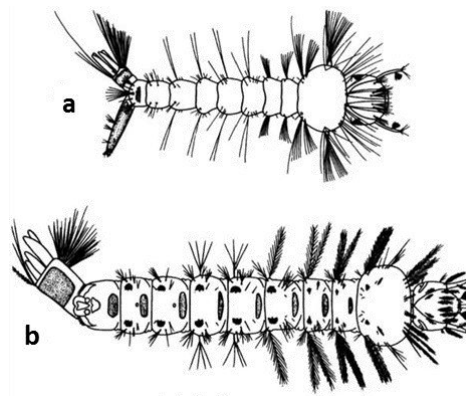


Figura 2: Larvas de mosquito: a) Subfamília Culicinae e b) Subfamília Anophelinae (Adaptado de Marquardt et al. 2005).

Como foi referido anteriormente, as fêmeas de mosquitos com importância médica são hematófagas embora também se alimentem de néctares, em oposição aos machos que se alimentam estritamente destes. A alimentação sanguínea é utilizada para a maturação ovárica e consequente desenvolvimento de ovos, no entanto, fêmeas de algumas espécies de mosquitos têm a capacidade de efetuarem posturas sem a ingestão de sangue, sendo denominadas autogénicas. A hematofagia efetua-se através do aparelho bucal picador-sugador, ou probóscis, adaptado à perfuração da pele dos hospedeiros (Figura 3). Os mosquitos são considerados solenofágicos uma vez que se alimentam diretamente nos capilares sanguíneos (Figura 3; C) (Araújo et al. 2012).

É no decurso da alimentação sanguínea das fêmeas que, ao injetarem saliva com anticoagulante e vasodilatadores nos vasos capilares para facilitar a alimentação, ocorre a inoculação de agentes patogénicos (Marquardt et al. 2005; Pereira Neves 2004).

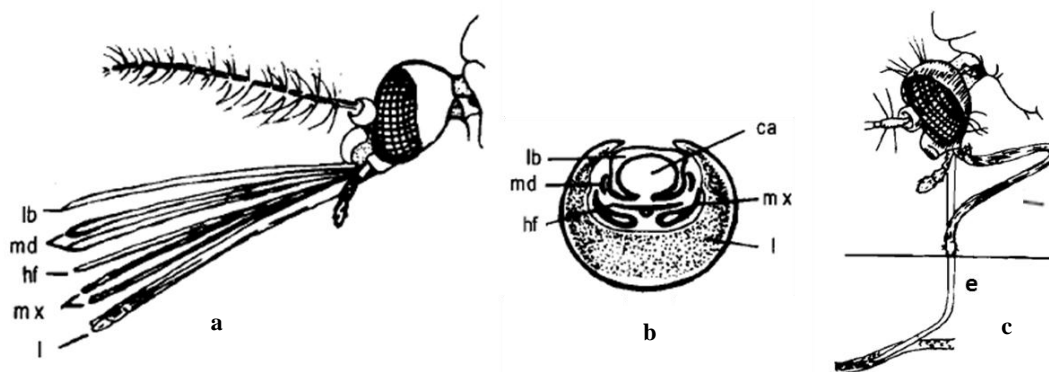


Figura 3: Representação esquemática do probóscis da família Culicidae. Representação lateral (a) e corte transversal (b) do probóscis: lb, labro; md, mandíbulas; hf, hipofaringe; mx, maxilas; l, lábio; ca, canal alimentar. Posição do aparelho bucal durante a alimentação solenofágica (c): l, lábio retraído e restantes estruturas inseridas no capilar sanguíneo (Adaptado de Pereira Neves 2004).

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é considerado uma das espécies de mosquitos com maior importância médica, sendo na atualidade o principal vetor de febre-amarela urbana, dengue e chikungunya nas regiões tropicais e subtropicais (Pereira Neves 2004). Espécie com marcado comportamento sinantrópico, repousa no interior das habitações ou abrigos animais – endofília, e apresenta marcada preferência por alimentações sanguíneas em humanos – antropofilia. Ao contrário de outras espécies de mosquito, *Aedes aegypti* tem hábitos de cópula,

picada e oviposição diurnos, podendo-se alimentar em mais que um hospedeiro durante um ciclo gonotrófico (Chistophers 1960; Pereira Neves 2004; Jansen e Beebe 2010). É considerado um mosquito endofágico alimentando-se preferencialmente no interior de instalações humanas. Apresenta uma fraca tendência para se dispersar ativamente ao longo de grandes distâncias, geralmente não excedendo os 200 metros do local de emergência. No entanto, fêmeas grávidas, que procuram locais de postura, podem voar 700 metros/dia. Quanto à sua longevidade, os dados disponíveis são muito variáveis, podendo viver entre uma semana a um mês, dependendo de condições atmosféricas como temperatura e humidade (Pereira Neves 2004). A sua forma adulta (Figura 4) é facilmente identificável: mosquito preto ou castanho-escuro que tem no escudo duas linhas médias transversais e lateralmente um padrão característico que faz lembrar uma lira, ambas formadas por escamas brancas (Pereira Neves 2004).



Figura 4: *Aedes aegypti* adulto. (a) Vista geral do macho (fotografia do autor); (b) pormenor do tórax com duas linhas médias transversais e lateralmente um padrão semelhante a uma lira; (c) pormenor do abdómen com marcas brancas laterais e linhas brancas basais (Imagens B e C adaptadas de ECDC 2012).

1.1.1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*

À semelhança dos restantes mosquitos, *Aedes aegypti* tem um ciclo de vida (Figura 5; A) em dois meios distintos: aquático (fases imaturas) e aéreo (fase adulta), passando por metamorfoses completas (insetos holometabólicos) (Chistophers 1960).

O ciclo de vida inicia-se com a oviposição. Os biótopos larvares são tipicamente recipientes embora a sua variedade seja vasta, podendo ir desde pratos de vasos de plantas ornamentais, latas e pequenos contentores no interior ou periferia das habitações humanas até pneus mal acondicionados, plantas ou partes de plantas que acumulam água. Após a seleção de um local adequado à postura, a fêmea alinha-se à superfície da água, na face interior do criadouro, de patas afastadas e abdómen fletido para baixo e para a frente, tocando com o último segmento do abdómen na água ou superfície do recipiente (Figura 5; B). Os ovos são colocados sobre ou acima da superfície da água, na parede interna do recipiente, enquanto a fêmea se movimenta lateralmente sobre ela. Após a postura de 15 a 20 ovos, a fêmea repousa por momentos e desloca-se para outro local, repetindo todo o processo (Chistophers 1960).

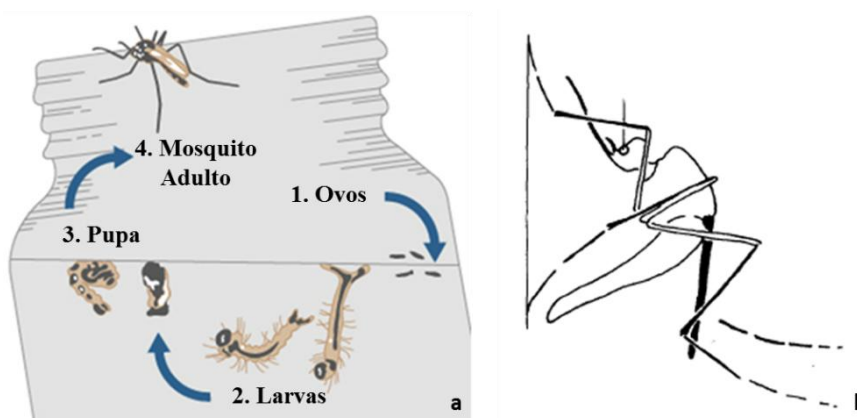


Figura 5: (a) Representação esquemática do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. As posturas são realizadas no interior de recipientes, tipicamente criadouros artificiais. Quando estes se enchem de água, dos ovos eclodem larvas que passam por quatro estádios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4), pupas e destas emergem adultos (Adaptado de Nature Education 2011). (b) Posição adotada pela fêmea antes da postura (Adaptado de Chistophers 1960).

No momento da postura, os ovos são brancos translúcidos, escurecendo com o tempo até ao preto. A sua forma é semelhante a um torpedo, coberto por manchas poligonais destacando-se visualmente como uma rede de linhas brancas. Estes ovos são

capazes de resistir à dessecação por longos períodos (mais de seis meses), característica importante devido ao tipo de criadouros utilizados, normalmente temporários.

Quando em contacto com a água, após um período de dois a quatro dias, em média, à temperatura de 26°C, dos ovos eclodem larvas, o que corresponde ao primeiro estado de desenvolvimento larvar, seguido por três ecdises sucessivas, levando aos segundo, terceiro e quarto estados larvares. As larvas alimentam-se de matéria orgânica em suspensão. Do último estado larvar surge a pupa. Da eclosão larvar até à pupa, com temperatura entre os 23 – 26°C, decorrem aproximadamente sete dias (Chistophers 1960; Pereira Neves 2004). Durante a fase de pupa, considerada um estado de quiescência, ocorre um profundo rearranjo tecidular, que mais tarde dará origem ao adulto. Esta fase é caracterizada pela cessação da alimentação e por movimentos rápidos em resposta a estímulos. No fim deste período de desenvolvimento emerge da pupa, por uma fenda em T, o adulto. Após repousar sobre a exúvia pupal, o adulto dispersa-se para se alimentar ou copular. As primeiras alimentações, para machos e fêmeas, são néctares. Geralmente as fêmeas podem copular poucas horas depois de emergirem, enquanto os machos somente após 24 horas, devido à necessidade da rotação de 180° da genitália. Depois da cópula, as fêmeas procuram hospedeiros vertebrados para efetuarem uma ou mais alimentações sanguíneas (para maturação ovárica) e iniciam um novo ciclo com a oviposição (Pereira Neves 2004).

1.1.2. Origem e distribuição mundial

Para compreender a distribuição mundial do mosquito *Aedes aegypti*, bem como a capacidade de se estabelecer em novos territórios, é necessário entender a sua capacidade de adaptação ao meio urbano e doméstico. Atualmente são conhecidas, pelo menos, duas subespécies de *Aedes aegypti*: *Aedes aegypti aegypti* e *Aedes aegypti formosus* (Chistophers 1960). A subespécie *Aedes aegypti formosus* é considerada a forma original, silvática, não antropofílica e enzoótica, presente nas florestas subsarianas do Leste e Centro do Continente Africano. Esta forma foi-se adaptando a criadores domésticos e à presença humana, originando com o tempo a subespécie *Aedes aegypti aegypti* (Halstead 2008). Mais tarde, as redes comerciais terão disseminado e introduzido *Ae. aegypti aegypti* em outras regiões da bacia do Mediterrâneo (incluindo Portugal e Espanha), onde terá permanecido até meados do séc. XX (Holstein 1967;

Halstead 2008). *Aedes aegypti aegypti* ter-se-á, igualmente, disseminado ao longo da costa africana (Moore et al. 2013), e restantes rotas marítimas entre Europa, Índia e Médio Oriente durante a expansão marítima portuguesa. A chegada ao continente Americano terá ocorrido nos séculos XV – XVII com o transporte de escravos para aquele continente (Halstead 2008). Posteriormente, com o crescimento do comércio marítimo, no séc. XVIII e XIX, a forma sinantrópica ter-se-á expandido até à Ásia a partir da África Oriental. Já no séc. XX, no decorrer da II Guerra Mundial, os movimentos de tropas e de material bélico pelas ilhas do Pacífico e Ásia terão aumentado a sua distribuição geográfica nesta região (Failloux et al. 2002; Gubler 2011). Desta forma, a expansão mundial de *Aedes aegypti* esteve sempre a par com a globalização, em que a atividade humana é o principal responsável pela sua dispersão, seja nas barricas de água doce das caravelas portuguesas, seja no transporte e comércio de pneus do séc. XX. A crescente área urbanizada na América Latina e sudoeste asiático, de expansão irregular e de elevada densidade populacional, é também um fator importante na dispersão local do vetor, uma vez que a presença humana cria biótopos favoráveis ao desenvolvimento de *Aedes aegypti* (Simmons et al. 2012). Geograficamente assume-se que a distribuição de *Aedes aegypti* ocorre entre os 45°N e os 35°S (Figura 6), contudo já foi registado em Odessa na Rússia (46° N) (Chistophers 1960).

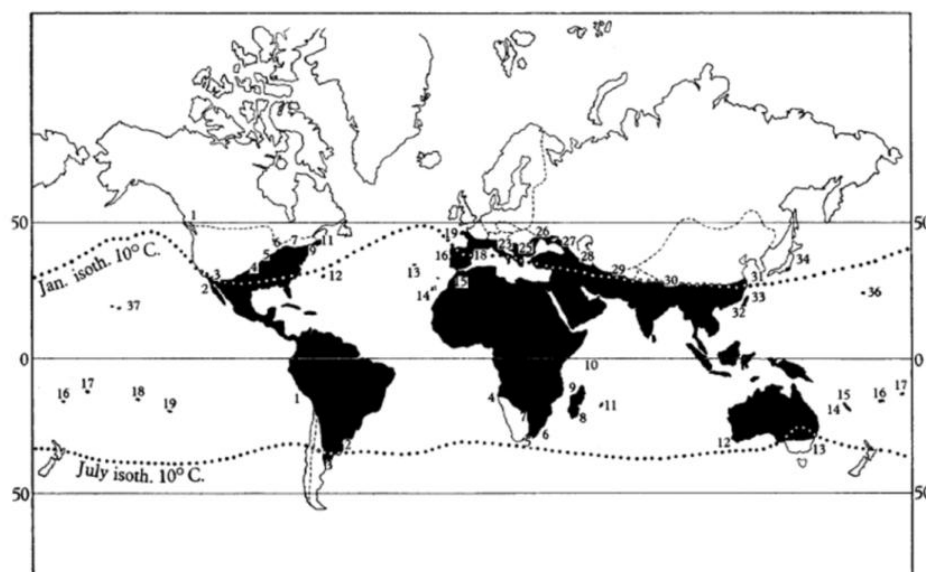


Figura 6: Limites tradicionais da distribuição de *Aedes aegypti* (Adaptado de Chistophers 1960).

1.1.1.1. *Aedes aegypti* na ilha da Madeira

Aedes aegypti foi identificado pela primeira vez na ilha da Madeira em Outubro de 2005 (Margarita et al. 2006), não havendo registo da sua presença nos estudos realizados entre Setembro de 1976 e Abril de 1977 (Capela 1981). No entanto, em Portugal Continental a sua presença foi registada até 1956 na região de Lisboa (Holstein 1967; Ribeiro et al. 1988). A identificação de *Aedes aegypti* foi realizada após captura intradomiciliária na freguesia de Santa Luzia na cidade do Funchal, depois de relatos por parte da população local sobre a presença de um mosquito de grande agressividade que, em muitos casos, causava reações alérgicas exacerbadas à sua picada.

Posteriormente foram realizadas prospeções de cariz entomológico, que registaram a presença de *Aedes aegypti* nas freguesias de São Gonçalo, Santa Maria Maior, São Pedro, Sé, São Martinho, Imaculado Coração de Maria e a confirmaram na freguesia de Santa Luzia (Figura 7) (Margarita et al. 2006).



Figura 7: Freguesias da cidade do Funchal onde foram capturados exemplares de *Aedes aegypti*, durante os primeiros inquéritos entomológicos, direccionados para esta espécie (Adaptado de Margarita et al. 2006).

Entre 2006 e 2008, a espécie disseminou-se pela costa sul chegando aos concelhos vizinhos da cidade do Funchal – Câmara de Lobos a Oeste e Santa Cruz a Leste (Gonçalves et al. 2008). Nos anos seguintes, 2008 a 2012, *Aedes aegypti* continuou a sua expansão pela costa sul da ilha, chegando aos concelhos de Ponta do Sol, Calheta e Machico. Em 2011 foi registado na costa norte, em Porto Moniz, mas prospeções seguintes mostram que não se estabeleceu de modo permanente nesta área

(ECDC 2014b). O sucesso da expansão de *Aedes aegypti* na ilha da Madeira está, provavelmente, associado a um conjunto de fatores favoráveis, tanto de cariz ambiental como humano. Trata-se de uma ilha densamente povoada, com zonas verdes de vegetação subtropical, presença de potenciais criadouros domésticos e condições atmosféricas favoráveis – época de chuvas longa, elevada humidade e temperatura ao longo do ano, raramente abaixo dos 15°C no inverno e acima dos 25°C no verão (Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2011). Na cidade do Funchal, ao contrário do que acontece em muitas regiões endémicas para *Aedes aegypti*, a proliferação do vetor não estará associada à falta de saneamento e deficiente gestão de resíduos urbanos, mas à tradição de cultivo de plantas ornamentais em vasos com pratos, no interior e exterior das habitações. Além destes criadouros, sarjetas, sistemas de drenagem de águas, telhados planos e poços abandonados, podem ser potenciais criadouros desta espécie (ECDC 2013).

A origem geográfica de *Aedes aegypti* encontrado na ilha da Madeira poderá ser a América Latina, nomeadamente o Brasil ou a Venezuela. Esta ideia é suportada pela análise genética de ADN mitocondrial (mtADN) e polimorfismos genéticos associados à resistência *kdr* (Seixas 2012).

1.1.3. Importância médica

Os mosquitos são responsáveis pela transmissão de inúmeras doenças parasitárias, bacterianas ou virais, além de muitos apresentarem comportamento tão antropofílico que, podendo não transmitir doenças, são agentes de extrema incomodidade (Capinera 2008). *Aedes aegypti* é vetor de inúmeros arbovírus, como os vírus do dengue e febre-amarela, família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, e o vírus chikungunya, família *Togaviridae*, género *Alphavirus* (Murray et al. 2006).

1.1.3.1. Febre-amarela

A febre-amarela (FA) é a febre hemorrágica de etiologia viral por excelência. Foi considerada como a doença letal mais temida antes do desenvolvimento da vacina nos anos 30 do séc. XX (Monath 2001). É transmitida a humanos pela picada de mosquitos dos géneros *Haemagogus*, nas Américas Central e do Sul e *Aedes* nas Américas Central, do Sul e África (Figura 8). O vírus causador desta arbovirose é

endêmico ou enzoótico em florestas tropicais da América do Sul e África causando, periodicamente, surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em Saúde Pública (Vasconcelos 2003).

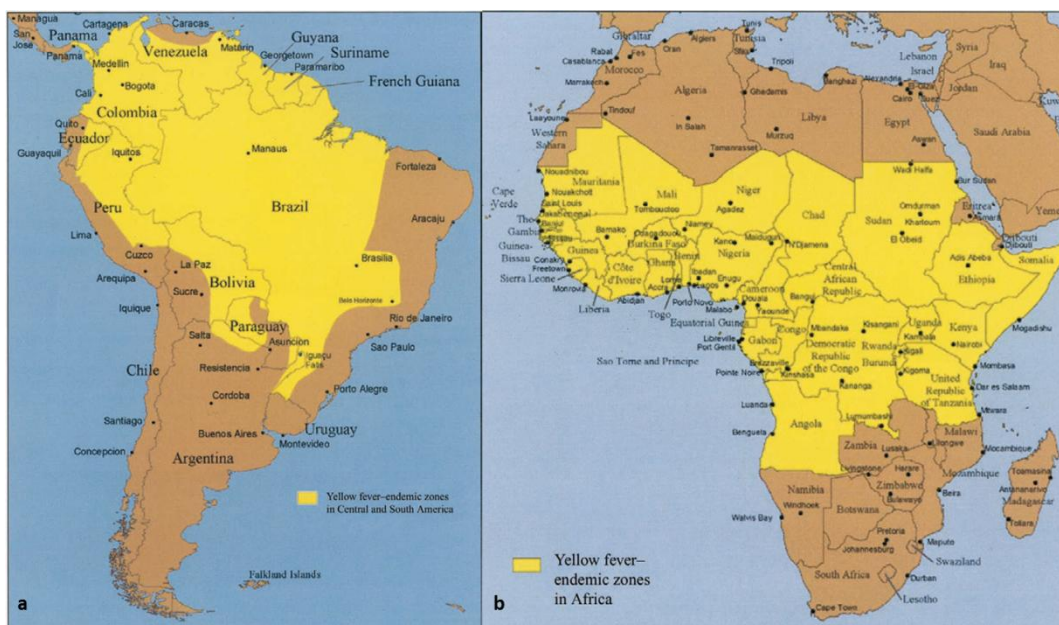


Figura 8: Endemicidade da Febre-amarela na América Latina (a) e África (b) (Adaptado de Barnett 2007).

O vírus da febre-amarela terá chegado ao Novo Mundo via transporte de escravos da costa Oeste de África. Nos séculos XVIII e XIX foram registadas várias epidemias nas Caraíbas, América Central e do Sul, sul dos Estados Unidos e na Europa (Rogers et al. 2006), sendo comum ocorrerem em portos marítimos. Em Portugal, o último surto de febre-amarela documentado ocorreu em Lisboa em 1857, tendo-se registado 1800 casos com 600 mortos sendo, provavelmente, *Aedes aegypti* o vetor responsável pela transmissão viral (Almeida 2011).

Anualmente, a febre-amarela apresenta cerca de 200.000 casos na América Latina e África, ocorrendo neste último continente 90% dos casos. Embora não tenham ocorrido casos de FA no sudoeste asiático, esta região é considerada de elevado risco devido à presença de *Aedes aegypti*, responsável pelo ciclo urbano e de uma população humana possivelmente suscetível à doença. Por outro lado, o facto da inexistência de casos de FA poderá ser explicado pela possível imunidade cruzada conferida à população humana local, por habitem numa região híper-endêmica para dengue, ou

mesmo pela falta de competência vetorial das populações de *Aedes aegypti* da região (Monath 2001).

1.1.3.2. Dengue

A infecção pelo vírus da dengue (DENV) pode ser causada por um dos 5 serotipos virais: DENV -1, -2, -3, -4 e -5, o mais recente serotipo do vírus da dengue (Gubler 1998a; Normile 2013), conferindo imunidade sero-específica (Gubler 1998a).

A frequência e magnitude das epidemias de dengue têm aumentado drasticamente nos últimos 40 anos, à medida que o vírus e os seus vetores se expandem pelas regiões tropicais e subtropicais do globo. A Figura 9 explicita bem a expansão dos diferentes serotipos do vírus da dengue nas últimas quatro décadas. Em 2012, a infecção pelo vírus da dengue foi considerada a principal arbovirose transmitida por mosquitos no mundo. Associados à sua (re)emergência podem ser considerados três fatores chave: urbanização, globalização e falência dos programas de controlo vetorial (Gubler 2011; WHO 2012). Segundo a OMS o vírus da dengue causa anualmente cerca de 50 a 100 milhões de novas infeções e 20.000 mortes em mais de 100 países (WHO 2012), enquanto outros estudos sugerem que o número de casos/ano de dengue tem sido subestimado, apontando para 390 milhões de novas infeções só em 2010, cerca de três vezes superior ao proposto pela OMS (Bhatt et al. 2013). Esta patologia é atualmente designada em duas grandes categorias: dengue sem sinais de alarme e dengue severo. Esta nomenclatura é recomendada pela (WHO 2009) dado que tais designações adaptam-se melhor ao novo panorama de doença global, permitindo aos clínicos uma melhor gestão dos casos. O tratamento destes doentes, na ausência de um composto antiviral específico ou medidas preventivas assentes na vacinação, depende inteiramente de terapias de suporte como controlo da febre, administração de fluídos e gestão das complicações hemorrágicas (Gubler 1998a; Halstead 2008), com custos de atendimento em ambulatório a rondarem os US\$ 514-1394 por caso (WHO 2009; WHO 2012).



Figura 9: Expansão global dos serotipos de dengue: (a) 1970 e (b) 2011 (Adaptado de Gubler 2011).

1.1.3.2.1. Surto de dengue na ilha da Madeira

A 3 de Outubro de 2012 foi declarado um surto de dengue na Região Autónoma da Madeira (DGS 2012), com os primeiros casos autóctones detetados no mês de Setembro (Alves et al. 2013). No Instituto Nacional de Saúde (INSA) foram realizados ensaios de natureza molecular, que identificaram o vírus do dengue serotipo 1 (DENV-1) como o agente causador do primeiro caso de dengue na ilha da Madeira e, provavelmente, o agente causador do surto (Alves et al. 2013). Até ser considerado controlado, a 03/03/2013 (semana 9/2013), foram notificados 2168 casos de dengue na ilha da Madeira e cerca de 81 casos exportados por viajantes que regressavam da ilha da Madeira. Destes, 11 foram detetados em Portugal Continental e 70 em 13 países europeus (DGS 2013b). Desde então, até à data não foram registados novos casos autóctones (DGS 2013a).

De acordo com os dados referentes ao número de casos prováveis de dengue até 25 de Novembro de 2012 (n=1891), 41,1% (777) dos casos ocorreram em homens e

58,9% (1114) ocorreram em mulheres com um rácio homem/mulher de 0,69. O grupo etário dos 25-64 anos, com uma mediana de idades de 39 anos, foi o mais afetado. Na maioria dos 1891 casos, os sintomas foram ligeiros, com febre, mialgias, cefaleias e artralgias, tendo ocorrido 111 internamentos. Geograficamente, o maior número de casos registados de febre de dengue foi entre os habitantes da freguesia de Santa Luzia, com mais de 500 casos registados (Sousa et al. 2012).

1.1.3.3. Chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV) é um arbovírus transmitido por mosquitos do género *Aedes*, isolado pela primeira vez em 1952 no planalto Makonde no sul da Tanzânia (Robinson 1955). O nome dado a esta arbovirose deriva dos dialetos africanos *Swahili* e *Maconde* que significa “andar curvado” aludindo aos sinais provocados pelas intensas dores articulares (Pialoux et al. 2007). Dois ciclos de transmissão estão associados ao CHIKV: um ciclo silvático em África e um ciclo urbano humano-mosquito-humano na Ásia, África, Oceano Índico e Europa (Thiberville et al. 2013). O CHIKV é endémico e epidémico em África, Ásia e, desde 2005, nas ilhas do Oceano Índico (Thiberville et al. 2013), onde ocorreu um surto nas ilhas Reunião que afetou 244.000 pessoas, tendo como principal vetor o mosquito *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) (Renault et al. 2007). Entre Julho e Setembro de 2007, foi registado o primeiro surto de CHIKV na Europa, na região de *Romagna* no norte de Itália, afetando 248 pessoas. O vetor implicado na transmissão do CHIKV foi o mosquito invasor *Aedes albopictus* (Sambri et al. 2008). O tratamento da infeção é estritamente sintomático e a prevenção dos casos assenta na diminuição do contacto entre os vetores e os humanos (Kucharz & Cebula-Byrska 2012). De momento não existe vacina, embora estejam a decorrer estudos desde 1960 para o seu desenvolvimento (Thiberville et al. 2013). A Figura 10 representa a dispersão do CHIKV, nos últimos 50 anos, em África, ilhas do Oceano Índico e Europa.



Figura 10: Dispersão do CHIKV de África para o Oceano Índico e Europa nos últimos 50 anos. As diferentes linhagens evolutivas são identificadas usando setas de cores diferentes (Adaptado de Lamballerie et al. 2008).

1.2. Controlo vetorial de *Aedes aegypti*

As doenças transmitidas por vetores são responsáveis por uma parte significativa das patologias mundiais, não afetando unicamente a saúde animal e humana, mas também o desenvolvimento económico (WHO 2004). A reemergência e emergência destas doenças resultaram, entre outros fatores, das mudanças nas políticas em saúde pública, que alteraram o seu enfoque da luta continuada contra o vetor para uma resposta a situações de emergência ou surto, do aumento das resistências aos inseticidas entre os artrópodes vetores, do aparecimento de agentes patogénicos resistentes a fármacos e das alterações demográficas e sociais (Gubler 1998b).

O controlo de *Aedes aegypti*, ao longo da sua história, está repleto de sucessos e insucessos. As grandes campanhas de erradicação de *Aedes aegypti* dos anos 1950 e 60 são a prova disso, tendo levado à quase total eliminação da transmissão de dengue e febre-amarela em muitos países da América Central e do Sul (Morrison et al. 2008). Infelizmente estas conquistas foram de curta duração. Após o abandono dos programas de controlo no início dos anos 70, toda a região neotropical viu aumentar, gradualmente, o número de casos de dengue em resultado de novas introduções de *Aedes aegypti* (Gubler 2011) ou expansão do vetor a partir de *foci* residuais.

Perante esta realidade, de expansão mundial de infeções pelo vírus da dengue e do seu principal vetor, *Aedes aegypti*, no ano 2000 foi aprovada a primeira Estratégia

Global para a Prevenção e Controlo da Dengue (WHO 2000), reafirmada recentemente (WHO 2012) e tendo como principal objetivo reduzir o peso da dengue.

A prevenção ou redução da transmissão do vírus da dengue depende quase exclusivamente do controlo dos seus principais vetores, nomeadamente *Aedes aegypti*, reduzindo a sua densidade e mantendo-a em níveis baixos ou interrompendo o contato entre estes e os humanos. As medidas de controlo devem ser direcionadas aos estados larvares e adultos nos seus habitats, seja por eliminação de criadouros favoráveis ao desenvolvimento dos estados imaturos ou por diminuição do acesso a estes, por redução da longevidade dos mosquitos fêmea através do uso de inseticidas ou por combinação das várias medidas de controlo disponíveis. A escolha dos métodos de controlo deve considerar a ecologia, o comportamento, os recursos disponíveis, o contexto cultural, social e económico, e a viabilidade de estes serem aplicados em tempo útil e de modo sustentável pelo período necessário (WHO 2009). Medidas de controlo eficazes e sustentáveis são essenciais para a obtenção e manutenção da redução da morbilidade associada à infeção pelo vírus da dengue. O uso de vários inseticidas em modo rotacional é uma estratégia que poderá ser utilizada no futuro de modo a prevenir/atrasar o desenvolvimento e/ou a dispersão de resistências (Hemingway et al. 2004).

Os métodos de controlo recomendados para combate a *Aedes aegypti* incluem a eliminação ou gestão de criadouros larvares, aplicação de larvicidas químicos, uso de agentes biológicos e aplicação de adulticidas (WHO 2009).

Com base nestas orientações e na ausência de uma harmonização na classificação dos métodos de controlo (Wermelinger & Ferreira 2013), serão descritos aqueles que, segundo o autor, se têm vindo a consolidar desde o início do séc. XXI, nomeadamente a gestão ambiental, o controlo químico, o controlo biológico e o controlo genético (Wermelinger & Ferreira 2013).

1.2.3. Gestão ambiental

A gestão ambiental inclui medidas de destruição, alteração e eliminação de embalagens, recipientes e outros biótopos propícios ao desenvolvimento dos mosquitos. Estes programas devem ser realizados simultaneamente com programas de educação sanitária, para a saúde e comunicação, que incentivem a participação da comunidade (WHO 1997). Estas ações são consideradas o pilar dos programas de controlo do

mosquito *Aedes aegypti*, devendo a seleção do tipo de intervenção ser adequada ao contexto local. Os métodos de gestão ambiental podem ser classificados em três tipos: (1) modificação ambiental, (2) manipulação ambiental e (3) modificação das habitações e comportamento humano (Rafatjah 1988; WHO 2009).

As estratégias de modificação ambiental são aquelas que incorporam alterações físicas duradoras nos habitats larvares, como a melhoria dos sistemas de distribuição e armazenamento de água, enquanto as estratégias de manipulação ambiental implicam medidas de cariz temporário nos biótopos do vetor, prevenindo a sua colonização, tornando-os menos atrativos a mosquitos. A modificação das habitações e comportamento humano implica ações do próprio para reduzir o contacto Homem-vetor-agente patogénico, seja por alteração de comportamentos de risco, seja por alterações físicas nas habitações e instalações humanas, como aplicação de redes mosquiteiras em janelas, portas e outros pontos de entrada (WHO 2009).

Em vários locais do mundo, medidas assentes em gestão ambiental, têm tido bons resultados no controlo de *Aedes aegypti*, caso do Vietnam que após a introdução em algumas comunidades de recipientes para recolha e armazenamento de água “anti-mosquito” conseguiu diminuir, significativamente, a utilização destes como locais de desenvolvimento dos imaturos de *Aedes aegypti* (Van 2011), provando que medidas de controlo simples, que alteram o potencial biótopo do mosquito, conseguem produzir efeitos significativos.

Uma das medidas de manipulação ambiental mais utilizada é a alteração da salinidade dos biótopos larvares (Rafatjah 1988). Esta tem sido uma medida utilizada no controlo de várias espécies de mosquitos, principalmente os que colonizam áreas costeiras e necessitam de alguma salinidade para a sua reprodução (Rafatjah 1988).

O oposto também ocorre. No caso de *Aedes aegypti*, as formas imaturas desenvolvem-se em água doce (<0,5g/L sal) e em alguns casos salobra (0,5 - 30g/L sal) (Chistophers 1960; Ramasamy et al. 2011). O aumento da salinidade dos biótopos dos imaturos de *Aedes aegypti* tem sido demonstrado em vários trabalhos como tendo efeito larvicida e pupicida (Mukhopadhyay et al. 2010; Jude et al. 2012). Embora o mecanismo de ação do sal como larvicida não seja conhecido, sabe-se que as larvas de *Aedes aegypti* dependem de moléculas orgânicas, como aminoácidos, para controlarem a pressão osmótica da hemolinfa, permitindo a sua adaptação ao meio aquático onde

habitam (Edwards 1982). A disrupção deste sistema poderá ser um dos mecanismos da ação larvívora do sal sobre as formas larvares.

1.2.4. Controlo químico

O controlo químico é uma das principais ferramentas para controlo de vetores em Saúde Pública (Braga & Valle 2007), desempenhando um papel central no combate aos principais vetores de doenças como são os mosquitos.

Os compostos químicos têm sido utilizados para o controlo do *Aedes aegypti* desde o início do século XX, mantendo-se até hoje como um dos principais pilares do controlo vetorial (Hemingway & Ranson 2000; Becker et al. 2003). No entanto, o número de inseticidas seguros, rentáveis e eficazes para o controlo de vetores decresceu, principalmente devido ao desenvolvimento de resistências, abandono de alguns princípios ativos por questões de segurança e diminuição do investimento na pesquisa e desenvolvimento de novos compostos devido aos elevados custos de associados (Zaim & Guillet 2002). Os inseticidas utilizados no controlo de mosquitos pertencem a quatro grupos químicos principais: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, e a uma classe especial denominada Reguladores do Crescimento de Insetos (RCI) (Becker et al. 2003).

1.2.4.1. Organoclorados

Os organoclorados (OC) foram os primeiros inseticidas sintéticos. Estes possuem um efeito neurotóxico, exercendo a sua ação por ingestão ou contato, tendo sido utilizados intensivamente na área da Saúde Pública (Braga & Valle 2007; Moreira et al. 2013). Dos inseticidas OC destaca-se o diclorodifeniltricloroetano (DDT), inseticida do grupo difenil-alifático (Figura 11). Este composto atua por ingestão e/ou contacto, interferindo com os canais de sódio das células nervosas, mantendo-os abertos e alterando o equilíbrio sódio-potássio bem como o impulso nervoso normal. A constante estimulação provoca paralisia seguida de morte do inseto (Moreira et al. 2013). Devido à sua eficácia contra formas adultas de mosquitos e ao seu efeito residual prolongado, o DDT revolucionou o combate à malária no período de 1946 a 1970, década em que a OMS proibiu a sua utilização devido aos problemas ambientais e de saúde associados à sua utilização e ao aparecimento de resistências em mosquitos. Mais

tarde, em 1995, a OMS propõe a utilização do DDT para controlo de mosquitos em pulverizações intradomiciliárias (D'Amato et al. 2002).

1.2.4.2. Organofosforados

Desenvolvidos a partir de 1940, os organofosforados (OP) são todos os inseticidas que contêm fósforo na sua estrutura. São muito utilizados na área da Saúde Pública por apresentarem vantagens em relação os organoclorados, nomeadamente por não se acumularem em tecidos biológicos e por serem biodegradáveis. Por outro lado, a sua instabilidade química obriga a aplicações frequentes (Braga & Valle 2007). Estes atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A enzima é fosforilada irreversivelmente levando à acumulação de ACh na fenda sináptica. Consequentemente, o sistema nervoso central é continuamente estimulado, desencadeando um processo de paralisia, culminando na morte do inseto (Braga & Valle 2007; Moreira et al. 2013). Entre os OP mais utilizados podemos destacar o *temephos* (Figura 12), para controlo de formas larvares de mosquitos, que devido à sua baixa toxicidade para mamíferos é utilizado numa grande variedade de ambientes aquáticos (Becker et al. 2003), incluindo a água para consumo humano [dose máxima recomendada 1mg/L de ingrediente ativo de *temephos* (WHOPES 2006)].

1.2.4.3. Carbamatos

Os carbamatos, como o *Benciocarb* (Figura 13), são inseticidas derivados do ácido carbâmico e a sua comercialização teve início na década de 1960. À semelhança dos organofosforados também inibem a AChE embora esta reação possa ser reversível (Braga & Valle 2007), permitindo a recuperação dos insetos expostos a doses baixas. Os inseticidas carbamatos têm sido utilizados eficazmente em populações de insetos resistentes a organoclorados e organofosforados (Becker et al. 2003).

1.2.4.4. Piretróides

Os piretróides (PY) pertencem a uma nova geração de inseticidas sintéticos, introduzidos no mercado na década de 1970, produzidos a partir do composto natural, piretro, extraído do crisântemo (*Chrysanthemum* spp.). São biodegradáveis e de baixa

toxicidade para aves e mamíferos, embora para animais aquáticos, principalmente peixes, sejam extremamente tóxicos. Estes atuam sobre o sistema nervoso periférico e central do inseto, tal como o DDT, exercendo a sua ação sobre os canais de sódio das células nervosas (Becker et al. 2003; Braga & Valle 2007; Moreira et al. 2013). Atualmente são utilizados para pulverizações intradomiciliárias e constituem o único grupo de inseticidas licenciados pela OMS para impregnar redes mosquiteiras (Figura 14) (Zaim et al. 2000; Zaim & Guillet 2002).

1.2.4.5. Reguladores do crescimento de insetos

Os reguladores do crescimento de insetos (RCI) pertencem a uma classe especial de inseticidas (Becker et al. 2003) que exercem a sua ação mimetizando as hormonas responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento dos insetos (Staal 1975).

Para a compreensão dos mecanismos de ação dos RCI, é necessário entender os mecanismos pelos quais as hormonas regulam os processos de crescimento nos insetos holometabólicos. Nestes, o crescimento ocorre durante a fase larvar, antes da primeira metamorfose, por processos periódicos de ecdise ou muda. Estes processos têm como hormonas centrais a ecdisona (E) e as hormonas juvenis (HJ). A ecdisona é segregada pela glândula protorácica, sendo fundamental na promoção e regulação do processo de ecdise e metamorfose, enquanto que a HJ, produzida pela glândula endócrina *corpus allatum* (CA), desempenha um papel central na metamorfose e na reprodução. Durante o desenvolvimento larvar, a HJ regula as ações da E, permitindo que esta promova as ecdises mas bloqueando a metamorfose. Por outro lado, quando as HJ estão ausentes, em períodos críticos do desenvolvimento do inseto, as células respondem à E formando as estruturas da seguinte fase metamórfica. Ou seja, na ausência de HJ, a E leva à cessação da alimentação da larva e compromete a formação da pupa. Durante o estado pupal a HJ desaparece e a E aumenta, promovendo o rearranjo tecidular e futura emergência de um adulto convenientemente formado (Capinera 2008; Riddiford 2012).

As alterações tecidulares que levam ao desenvolvimento do inseto adulto estão muito bem coordenadas entre a ecdisona, a hormona juvenil e outras. A interferência neste equilíbrio, por hormonas exógenas, sintéticas ou não, leva à interrupção do normal crescimento e desenvolvimento do inseto. Desde o início dos anos 70 que numerosos

análogos das hormonas juvenis (AHJ) têm sido testados quanto à sua capacidade como inibidores da emergência de adultos (Dhadialla et al. 1998).

Entre os AHJ, podemos destacar o Piriproxifeno (PPF) (Figura 15). O PPF não atua diretamente matando as larvas, mas sim no seu normal desenvolvimento embriogénico, morfogénico e reprodutor (Invest & Lucas 2008). Durante o período de desenvolvimento larva-pupa-adulto, a persistência do piriproxifeno no biótopo larvar pode resultar, dependendo do momento de aplicação, num estado “virtualmente” permanente de muda larva-larva ou metamorfose larva-pupa, impossibilitando a emergência de adultos viáveis e consequentemente a sua morte (Dhadialla et al. 1998). A OMS classifica-o como não genotóxico e não carcinogénico tornando-o, do ponto de vista da Saúde Pública muito seguro (WHOPES 2001), sendo mesmo indicado para o tratamento de água para o consumo humano (WHOPES 2006) e criadouros artificiais (WHOPES 2013) numa dose máxima de 0,01mg/L PPF sob a forma de grânulo. No entanto, é designado como moderadamente tóxico para peixes e altamente tóxico para o zooplâncton (IPCS & IOMC 2010).

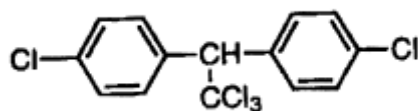


Figura 11: Estrutura química do DDT (Diclorodifeniltricloroetano) (Adaptado de Becker et al. 2003).

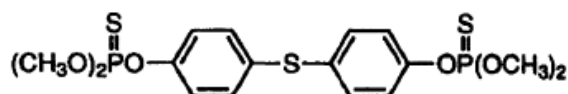


Figura 12: Estrutura química do organofosforado *temephos* (Adaptado de Becker et al. 2003).

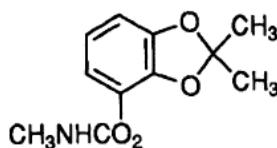


Figura 13: Estrutura química do carbamato *Benciocarb*, utilizado amplamente como inseticida em pulverizações intradomiciliárias, devido ao seu efeito residual (Adaptado de Becker et al. 2003).

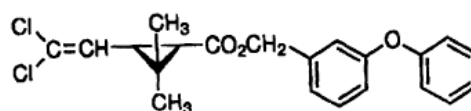


Figura 14: Estrutura química do piretróide permetrina, utilizado para impregnar redes mosquiteiras e outras peças de roupa (Adaptado de Becker et al. 2003).

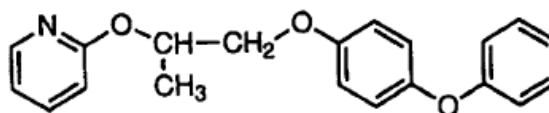


Figura 15: Estrutura química do RCI piriproxifeno (PPF) (Adaptado de Becker et al. 2003).

1.2.5. Controle biológico

Controle biológico pode entender-se como a redução de uma população vetora, por introdução no seu meio ambiente de agentes predadores, competidores, parasitas e/ou toxinas de origem biológica. Este tipo de medidas tem como vantagem a não contaminação química do ambiente, a especificidade dos agentes utilizados e a eventual autodispersão dos mesmos. Por outro lado, a sua aplicação pode ser limitada devido aos custos elevados, difícil implementação e utilização restrita em ambientes aquáticos (Pereira Neves 2004; WHO 2009; Rodríguez-Péres et al. 2012).

Historicamente, a primeira campanha de controle biológico com sucesso, terá sido a utilização de agentes predadores para controle de larvas de mosquito no início de 1900, com a introdução nos arrozais de muitos países de peixes larvívoros do género *Gambusia*. No decorrer dos anos 40 e 50 do século passado, com a descoberta e aplicação em larga escala do DDT, o recurso ao controle biológico diminuiu, ressurgindo nos anos 1960/70 devido aos riscos ambientais associados aos inseticidas químicos e aparecimento das primeiras resistências em mosquitos (Becker et al. 2003).

Atualmente, a aplicação de toxinas das bactérias entomopatogénicas *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* [nova nomenclatura de *Bacillus sphaericus* (Ahmed et al. 2007)], são os casos mais comuns de controle biológico de formas larvares de mosquitos (Becker et al. 2003). Outras ferramentas têm sido utilizadas eficazmente neste controle, como o espinosade (Bond et al. 2004; Darriet et al. 2005; Kemabonta & Nwankwo 2013), copépodes predadores (Kay & Vu 2005), fungos

entomopatogénicos (revisto em Scholte et al. 2004) e bactérias intracelulares como *Wolbachia* (Oliveira & Moreira 2012).

Nesta revisão daremos relevância aos produtos com origem na bactéria entomopatogénica *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* serotipo H-14 (*Bti*) e aos produtos da fermentação aeróbia da actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa*.

1.2.5.1. *Bacillus thuringiensis*

A era do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) teve seu início quando, em 1901, o cientista japonês Shigetane Ishiwata, ao investigar a doença causadora de milhares de mortes entre os bichos-da-seda, isolou a bactéria responsável por essas mortes, a que deu o nome de *Bacillus soto*. Anos mais tarde, em 1911, o cientista alemão Ernst Berliner, isolou de uma larva de traça morta, uma estirpe de bactéria semelhante à anterior, a que deu o nome de *Bacillus thuringiensis* (Ibrahim et al. 2010).

O *Bt* é uma bactéria gram-positiva, móvel, anaeróbia facultativa, pertencente à Família Bacillacea, caracterizada pela capacidade de formar cristais para-esporais, durante as fases III e IV do processo de esporulação, anexos ao endósporo e que apresentam propriedades entomopatogénicas. Diferentes subespécies de *Bt* sintetizam distintos cristais para-esporais (Bechtel & Bulla Jr. 1976; IPCS 1999). Os cristais para-esporais, constituídos por proteínas conhecidas por “*insecticidal crystal proteins*” (*ICPs*), podem apresentar diferentes formas (bipiramidais, cuboide, esféricos ou irregulares) dependendo da sua constituição proteica, (Schnepf et al. 1998). Em muitos estudos o nome δ -endotoxinas surge em substituição de *ICPs*, embora o termo endotoxina seja, na prática, sinónimo de lipopolissacarídeo, a molécula predominante nas membranas externas das bactérias gram-negativas (Canas Ferreira & Sousa 1998). As *ICPs* são classificadas como Proteínas Cristal (Cry) ou Proteínas Citolíticas (Cyt). Estas são tóxicas para uma grande variedade de larvas de insetos, e outros invertebrados (Bravo et al. 2007) e são codificadas pelos genes: *cry* e *cyt* (IPCS 1999). Atualmente a nomenclatura das proteínas Cry e Cyt é baseada, principalmente, na sua sequência de aminoácidos, embora inicialmente a nomenclatura proposta se tenha baseado na atividade inseticida (Crickmore et al. 1998).

Até à data, foram identificados e descritos 300 holótipos proteicos da espécie *Bacillus thuringiensis* e cerca de 770 proteínas Cry e Cyt (Crickmore et al. 2013). Ambas as proteínas, Cry e Cyt, pertencem à classe das toxinas bacterianas conhecidas como Toxinas Formadoras de Poros (TFP) (Bravo et al. 2011). Até 1998, foram identificadas cerca de 67 subespécies de *Bt*, sendo a sua diferenciação realizada a partir de análises serológicas do antígeno flagelar (H), análise morfológica e características bioquímicas (IPCS 1999). Entre as subespécies já identificadas e descritas, encontra-se *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis*, serotipo H14 (*Bti*). Comercialmente, a maioria das formulações de *Bt* contém *ICPs* e esporos viáveis, porém, algumas das formulações de *Bti* contêm esporos inativos (IPCS 1999).

1.2.5.1.1. Mecanismo de ação

Para que o *Bt* possa exercer a sua atividade tóxica, é necessário que ocorra uma série de eventos que se iniciam com a ingestão de *Bt* esporulado, ou de endósporos e corpos para-esporais ou *ICPs*, pelas larvas dos insetos-alvo (IPCS 1999).

No modelo considerado como o clássico (Vachon et al. 2012), após a ingestão, o cristal é dissociado no lúmen do intestino-médio, devido ao pH alcalino, deixando livres as *ICPs*. Estas encontram-se num estado não-ativo (protoxinas). Ao serem clivadas por proteases intestinais do inseto, são convertidas em polipéptidos biologicamente ativos (toxinas ativas) (Carroll & Ellar 1993). Depois de ativadas, as proteínas Cry interagem com recetores específicos das membranas celulares do intestino médio, inserem-se nas mesmas formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana celular, alterando o equilíbrio homeostático das células, levando à destruição da célula por lise e por fim à morte do hospedeiro. As proteínas Cyt interagem diretamente com os lípidos das membranas apicais das células do intestino médio, constituindo os seus efeitos tóxicos a destruição das membranas por ação detergente ou atuando como recetores membranares para as proteínas Cry, potenciando a sua ligação às membranas das células intestinais (Bravo et al. 2007). Os endósporos de *Bt* exercem efeitos inseticidas, potenciando os efeitos das *ICPs*, ao invadirem e germinarem no interior da larva após a lise das células intestinais, causando morte por septicémia (IPCS 1999).

Na Figura 16 encontra-se representado o mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis* em Lepidoptera, que no seu fundamento é idêntico à forma como atua em larvas de dípteros, nomeadamente culicídeos.

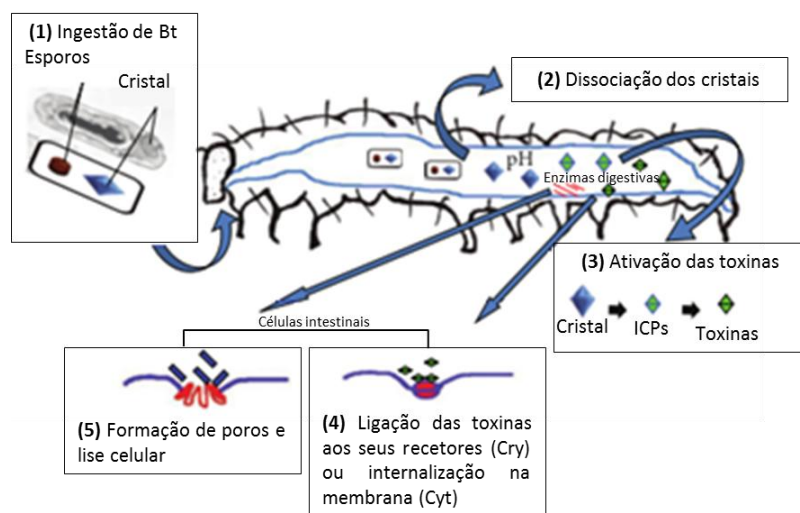


Figura 16: Mecanismo de ação do *Bt* em Lepidoptera: (1) ingestão do *Bt*; (2) dissociação dos cristais; (3) ativação das toxinas (4) ligação das toxinas aos seus recetores (Cry) ou internalização na membrana (Cyt); (5) formação de poros e lise celular (Adaptado de Schünemann et al. 2014).

1.2.5.1.2. *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis*

Em 1977, os investigadores Goldberg e Margalit isolaram de uma lagoa do deserto do *Negev*, Israel, uma bactéria da espécie *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis*, que apresentava propriedades entomopatogénicas contra membros da Ordem Diptera. Os seus cristais para-esporais são constituídos por inclusões cristalinas compostas pelas proteínas Cry4Aa (125kDa), Cry4Ba (135kDa), Cry10Aa (58kDa), Cry11Aa (68kDa), Cyt1Aa (28kDa) e Cyt2Ba (30kDa) (Ferreira & Silva-Filha 2013), específicas para larvas de dípteros, em especial culicídeos, simulídeos e quironomídeos (Laurence et al. 2011). As propriedades larvicidas das proteínas purificadas foram analisadas individualmente no trabalho de Ibarra e Federice, mostrando que todas as *ICPs* são larvicidas, mas nenhuma é tão tóxica quanto os cristais para-esporais intactos, sugerindo uma ação sinérgica entre as proteínas Cry e Cyt (Ibarra & Federici 1986). Esta ação sinérgica foi demonstrada no trabalho de Pérez e colegas (2005) ao verificarem que a proteína Cyt1Aa inserindo-se nas membranas das células do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, funcionava como recetor da proteína Cry11Aa, facilitando a inserção desta na membrana e potenciando o seu efeito tóxico. Wirth e

colegas (2005), por outro lado, demonstraram que a presença da proteína Cyt1Aa retarda o aparecimento de resistência à proteína Cry11Aa em populações de *Culex quiquefasciatus*, com diferentes graus de resistência às proteínas Cry11Aa, Cyt1Aa ou ambas. Assim, a presença de sinergismos no modo de ação do *Bti* reduz a probabilidade de aparecimento de resistências (Becker et al. 2003), embora tal já tenha sido registado numa população de *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae) no estado de Nova Iorque, EUA (Paul et al. 2005). O *Bti* representa hoje a melhor alternativa aos inseticidas químicos no controlo das formas larvares de mosquitos. As toxinas do *Bti* são seguras para as espécies não-alvo e para a saúde humana, com a vantagem de também apresentarem baixa persistência no meio ambiente (Laurence et al. 2011).

Atualmente, existem várias formulações comerciais contendo *Bti* como: grânulos solúveis em água, pó molhável, suspensões concentradas, grânulos, grânulos de gelo, tabletes e pó técnico (Becker et al. 2003). À semelhança do PPF, o *Bti* é considerado pela OMS como composto da classe “U”, ou seja, pouco provável de vir a causar situações de perigo agudo (...“unlikely to present acute hazard”...) (IPCS & IOMC 2010)

1.2.5.2. Espinosade

A descoberta do espinosade teve início nos anos 80, no decorrer de um longo programa de rastreio dos produtos da fermentação da actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa*, isolada de uma amostra de solo das Ilhas Virgens (Mertz & Yao 1990; Thompson et al. 2000). O espinosade é definido como a combinação dos dois principais metabolitos da fermentação aeróbia da *Saccharopolyspora spinosa*, denominados espinosinas A (componente maioritário) e D (componente minoritário) (Figura 17). As espinosinas são macrólidos tetracíclicos (Thompson et al. 2000), tendo sido isoladas mais de 20 espinosinas com diferentes níveis de atividade larvicida (Sparks et al. 2001). Surge inicialmente para controlo de pragas agrícolas, estando registado para utilização em mais de 100 culturas em 24 países (Thompson et al. 2000).

A utilização do espinosade como inseticida apresenta várias vantagens ambientais: degradação microbiana e por fotólise (Thompson et al. 2000), seletividade contra insetos-alvo das ordens Lepidoptera e Diptera e baixa toxicidade para mamíferos, animais aquáticos e aves (Kirst 2010). O espinosade é considerado um composto da

classe III, ou seja, ligeiramente perigoso (...“slightly hazardous”...) (IPCS & IOMC 2010).

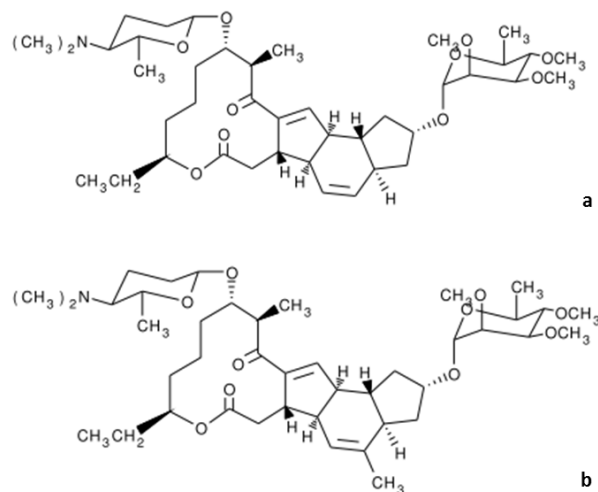


Figura 17: Estrutura química dos dois principais constituintes do espinosade: (a) espinosina A, componente maioritário e (b) espinosina D, componente minoritário (Adaptado de WHO 2007).

1.2.5.2.1. Mecanismo de ação

Embora o mecanismo de ação do espinosade não esteja totalmente desvendado, os estudos realizados até à data demonstram que o seu modo e local de ação diferem de todos os outros inseticidas (Salgado & Sparks 2010), atuando tanto por contato como por ingestão (Eger & Lindenberg 1998). Salgado (1998), observando os sintomas de intoxicação por espinosade, caracterizados por contrações musculares, fadiga e morte, propõe um mecanismo de ação envolvendo os recetores nicotínicos e do ácido gama-aminobutírico (GABA-R) das células nervosas pós-sinápticas, e demonstra que os seus efeitos derivam das espinosinas e não dos seus metabolitos. Em estudos eletrofisiológicos de células nervosas de vários insetos, ficou demonstrado que as espinosinas atuam em recetores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) e nos GABA-R (Watson 2001). Mais tarde, a utilização de células neurais de baratas mostrou que as espinosinas atuam sobre nAChR diferentes daqueles que são o local de ação de inseticidas como os neonicotinóides (Salgado & Saar 2004). Estes achados foram confirmados por estudos genéticos em *Drosophila*, que mostraram que as espinosinas têm como local-alvo a subunidade $\alpha 6$ dos nAChR e que os inseticidas neonicotinóides (ex. imidacloprida) não se ligam a esta subunidade (revisto em Millar e Denholm 2007). Orr e colegas (2009), demonstraram a ausência de resistências cruzadas entre o

espinosade e outros inseticidas que atuam sobre os nAChr, evidenciando as vantagens deste biocida como importante ferramenta no controlo de insetos-praga.

1.2.6. Controlo genético

O conceito de controlo genético abrange todos os métodos pelos quais um mecanismo de controlo de pragas ou vetores é introduzido numa população local através do acasalamento (Pates & Curtis 2005).

A técnica mais antiga e de provas dadas é a “*Sterile Insect Technique*” (*SIT*). Proposta inicialmente por Knippling em 1955 para controlo de pragas agrícolas, é um método específico para a espécie-alvo, não poluente, que depende da libertação de um grande número de insetos estéreis numa determinada área (Alphey et al. 2010). Machos estéreis, por radiação ou químicos esterilizantes, são libertados em massa numa área e, ao acasalarem com as fêmeas locais, conduzem a descendência não viável. A contínua libertação destes machos pode levar à eliminação ou à redução da densidade da população para valores muito baixos. Assim, a *SIT* pode ter lugar em programas de controlo vetorial que visam a erradicação de uma espécie (Alphey et al. 2010).

Outro método de controlo genético é o *RIDL* – “*Release of Insects Carrying a Dominant Lethal*”, semelhante ao *SIT* no conceito-base, mas com melhorias técnicas na criação e seleção em laboratório. Ao contrário do *SIT*, os machos transportam mutações genéticas específicas que são transmitidas à descendência do sexo feminino. Uma das abordagens é a libertação de machos que transportam mutações que interferem nos músculos de voo, tornando a descendência do sexo feminino incapaz de voar. Outra abordagem é a transmissão de mutações que induzem a mortalidade nas fêmeas descendentes dos machos libertados, em estádios avançados de pupa ou adulto. A criação em laboratório destes mosquitos é conseguida pelo controlo das mutações através da incorporação de um repressor, por exemplo, na alimentação (McGraw & O’Neill 2013).

1.2.7. Controlo vetorial de *Aedes aegypti* na ilha da Madeira

O controlo vetorial na ilha da Madeira pode ser dividido em três períodos, pós-deteção da presença do mosquito (2005-2008), pré-surto (2009-2012) e surto (2012). Entre 2005 e 2008 as atividades de controlo de *Aedes aegypti* incluíram pulverizações intradomiciliares com alfa-cipermetrina (Fendona®) e nebulizações ULV (Ultra-Low-Volume), extra domiciliares, com tetrametrina e d-fenotrina (Killigerm® ULV500). Espaços públicos e locais de armazenagem foram tratados com piretrina (Pybuthrin® 33) e foi aplicado *Bti* no tratamento de poços e outras fontes de água estagnada (Melim 2009). Estas ações foram essencialmente realizadas na freguesia de Santa Luzia, área onde a espécie foi pela primeira vez identificada e onde registava maior abundância. No entanto, apesar dos esforços desenvolvidos a população de *Aedes aegypti* expandiu-se para os concelhos vizinhos. Assim, foi necessário implementar um plano de monitorização e as estratégias de controlo vetorial passaram a centrar-se em programas de educação para a saúde visando o envolvimento da comunidade na remoção e eliminação dos biótopos larvares de *Aedes aegypti* que, à data já estavam identificados como sendo pequenos criadouros artificiais domésticos, ou peridomésticos. Com a declaração do surto, as estratégias de controlo foram intensificadas e a pulverização intra e extradomiciliar retomada para locais e estruturas específicas, tais como o Hospital Nélcio Mendonça, o Centro de Saúde de Bom Jesus e a Escola Secundária Francisco Franco.

1.3. Mosquitos e os seus mecanismos de resistência a inseticidas

A resistência aos inseticidas é um problema crescente e grave, afetando principalmente aqueles que dependem dos inseticidas para a sua proteção, seja através de programas de controlo vetorial, em medicina animal ou humana, ou na proteção de culturas agrícolas (WHO 1998).

O termo ‘resistência’ pode ser definido como a ‘incapacidade das doses recomendadas de inseticidas matarem uma população vetora alvo’ (WHO & RBM 2012), tratando-se de um fenómeno estritamente genético, com mutações que afetam as proteínas alvo dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (Moreira et al. 2013). Em contraste com a resistência, a tolerância aos inseticidas é uma tendência natural e não um resultado de uma mudança forçada na constituição genética de uma população. Por

consequente, a tolerância é muitas vezes considerada como uma resistência natural (Capinera 2008). Com o aumento das resistências em populações de mosquitos, como *Aedes aegypti*, estratégias efetivas para a sua monitorização são cada vez mais importantes. Apesar de terem sido realizados avanços na compreensão dos processos bioquímicos, moleculares e ecológicos dos mecanismos de resistência (Georghiou 1994), o desenvolvimento de novos inseticidas tem vindo a decrescer, levando a que a compreensão dos processos de resistência se torne ainda mais relevante, permitindo a produção de inseticidas direcionados especificamente contra estirpes resistentes de mosquitos (Karunaratne 1998). Atualmente estão descritos dois tipos de mecanismo de resistência com importância para os programas de controlo de vetores: resistências associadas ao metabolismo dos inseticidas e resistências por alteração do local-alvo. Resistências por diminuição da penetração do inseticida ou por alterações comportamentais que limitam o contato entre os insetos e estes compostos são, também, possíveis de ocorrer, embora com menor relevância que as anteriores (Karaagac 2011).

1.3.3. Resistências associadas ao metabolismo dos inseticidas

A destoxicação de xenobióticos é um importante mecanismo de defesa utilizado pelos insetos e outros seres vivos para minimizarem os efeitos nocivos desses produtos.

O metabolismo dos inseticidas é o processo pelo qual os insetos, através de múltiplas vias enzimáticas, degradam os inseticidas em moléculas não tóxicas. As enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos podem ser divididas em enzimas de Fase 1 e Fase 2. As enzimas de Fase 1 reconhecem e atuam diretamente sobre os inseticidas, introduzindo um grupo polar reativo e permitindo a ação das enzimas de Fase 2. Associadas a estas vias metabólicas de transformação estão as enzimas destoxicantes de Fase 1 como as citocromo P450 (P450) e as esterases (Est) e de Fase 2 como as glutatíon-S-transferases (GSTs) e as UDP-glicosiltransferases (UDPGT) (Braga & Valle 2007; Perry et al. 2011). O aparecimento de resistências associadas às vias metabólicas está relacionado com várias alterações genéticas. Nestes casos as enzimas destoxicantes sequestram ou metabolizam os inseticidas, mais rápida e eficazmente, impedindo que estes atinjam os seus locais de ação (Karunaratne 1998).

1.3.3.1. Resistências associadas às citocromo P450

Citocromo P450 (P450) é o nome genérico atribuído a uma superfamília enzimática de hemoproteínas que catalisam o metabolismo oxidativo, por processos de monoxigenação, de uma grande variedade de substratos endógenos (ex. esteroides) ou exógenos (ex. inseticidas). As P450 estão presentes em todos os seres vivos e são o produto de um vastíssimo número de genes, cuja expressão é condicionada pelo estado de desenvolvimento do organismo ou pela ação de agentes reguladores endógenos como exógenos. O facto de muitos genes das P450 poderem ser induzidos e/ou reprimidos por sinais químicos ambientais está diretamente relacionado com a sua função biológica de defesa (Quintas et al. 2008). Nos insetos, as P450 encontram-se principalmente no retículo endoplasmático e mitocôndria das células do intestino, corpo adiposo e tubos de Malpighi. O metabolismo oxidativo aumentado é considerado como o principal mecanismo de resistência a todas as classes de inseticidas, com exceção dos ciclodienos (classe OC) (Braga & Valle 2007; Hemingway et al. 2004). As P450 estão principalmente associadas ao metabolismo dos piretróides e com menos relevância ao metabolismo dos organofosforados e carbamatos (Hemingway & Ranson 2000).

Marcombe e colaboradores evidenciaram que as P450 estão associadas a mecanismos de resistência à deltametrina (classe PY) em mosquitos adultos *Aedes aegypti* da ilha Martinica e com menos relevância na destoxicação de *temephos* (classe OP) em larvas da mesma população de mosquitos (Marcombe et al. 2009).

1.3.3.2. Resistências associadas às esterases

As esterases (Est) são um grupo de enzimas que possuem um resíduo de serina no seu centro ativo, capazes de hidrolisar compostos que na sua estrutura contenham ésteres carboxílicos. A resistência mediada pelas Est é o principal mecanismo de resistência a inseticidas OP, e secundariamente, aos carbamatos em mosquitos (Hemingway & Karunaratne 1998). Fenómenos de amplificação genética estão, frequentemente, na base da resistência mediada por esterases através de mecanismos de sequestração do composto inseticida. Por outro lado, a presença de resistência como resultado de um aumento da taxa metabólica pode estar associada a mutações de genes estruturais (Hemingway 2000).

1.3.3.3. Resistências associadas às glutatíão-S-transferases

As glutatíão-S-transferases (GST) são membros de uma grande família de enzimas intracelulares envolvidas em vias de destoxicação de substâncias endógenas e exógenas, transporte intracelular e processos de sinalização nos insetos e outros seres vivos. Níveis elevados de GST foram associados a processos de resistência em muitos insetos, desempenhando um papel importante na resistência dos mosquitos ao DDT (classe OC) (Hemingway 2000; Che-mendoza et al. 2009).

1.3.3.4. Resistências associadas às UDP-glicosiltransferases

As UDP-glicosiltransferases (UDPGTs) são enzimas que desempenham funções nos processos metabólicos, particularmente na destoxicação de xenobióticos, como aleloquímicos ingeridos por larvas, na formação da cutícula, pigmentação e olfato, por mecanismo de glucosidação tendo como dador de glucose a UDP-glucose (Huang et al. 2008). As UDPGTs foram recentemente associadas a mecanismos de resistência à permetrina (Poupardin et al. 2012) e ao *temephos* (Grisales et al. 2013) em *Aedes aegypti*, embora já tenham sido associadas a resistências a organofosforados em *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) (Bull & Whitten 1972).

1.3.4. Resistências por alteração do local-alvo

As resistências por alteração dos locais-alvo dos inseticidas decorrem de modificações dos locais de ação dos inseticidas, dificultando ou impedindo as interações entre a molécula-alvo e o inseticida (Karunaratne 1998).

1.3.4.1. Resistências associada aos recetores nicotínicos da acetilcolina

Os recetores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) são canais iônicos transmembranares regulados pela acetilcolina (ACh) com função excitatória presentes em vertebrados e invertebrados. Nos insetos são os recetores excitatórios pós-sinápticos mais abundantes dos tecidos nervosos, justificando a sua importância como alvo de inseticidas. Atualmente estes são local de ação de várias classes de inseticidas: nicotínicos, neonicotinóides e espinosade (revisto em Millar & Denholm 2007).

1.3.4.2. Resistências associadas à acetilcolinesterase

A AChE é a enzima responsável pela degradação do neurotransmissor ACh que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura dos canais de sódio na célula pós-sináptica. Em situações normais, após a cessação do estímulo excitatório a ACh é removida da fenda sináptica por degradação enzimática ou captação pelas células pré-sinápticas. Na presença de carbamatos e organofosforados a AChE é inibida, perdendo a capacidade de degradar a ACh. O aparecimento de resistências está relacionado com a diminuição da afinidade da AChE aos inseticidas, o que leva à interrupção normal, ou quase, do estímulo nervoso (Hemingway et al. 2004; Braga & Valle 2007; Moreira et al. 2013).

1.3.4.3. Resistências associadas aos canais de sódio – resistências “knockdown” (*kdr*)

Os canais de sódio dependentes da voltagem são proteínas transmembranares responsáveis pela transmissão do potencial de ação através das células excitáveis. Em situações normais os canais de sódio, em resposta à despolarização da membrana, abrem permitindo o influxo de íons de sódio, invertendo a carga elétrica da membrana. Estes fecham após alguns milissegundos, bloqueando a entrada de íons de sódio levando a que a membrana volte ao seu estado de repouso (Dong 2007).

Devido ao seu papel crucial na condução do impulso nervoso, os canais de sódio são o alvo dos inseticidas piretróides e do DDT (classe OC). Estes inseticidas atuam promovendo a abertura dos canais de sódio, mantendo a despolarização da membrana e consequente propagação do impulso nervoso (Hemingway et al. 2004; Dong 2007; Braga & Valle 2007). As mutações nos genes que codificam para os canais de sódio têm sido associadas a resistências aos inseticidas piretróides e DDT, tendo sido detetadas em várias populações de *Aedes aegypti* (Marcombe et al. 2009; Marcombe et al. 2012; Seixas 2012).

1.3.4.4. Resistências associadas ao recetor do GABA

O recetor do ácido gama-aminobutírico (GABA-R) é um canal iónico dependente do ácido gama-aminobutírico (GABA), presente no sistema nervoso central e neuromuscular dos insetos, com funções inibitórias do impulso nervoso por

hiperpolarização das células excitáveis. Em resposta ao GABA, o canal abre deixando entrar íons cloro para o meio intracelular, hiperpolarizando a célula e terminando o impulso nervoso. Os GABA-R são local de ação dos inseticidas ciclodienos e policloroterpenos (classe OC), PY (Hemingway & Ranson 2000) e secundariamente do espinosade (Salgado 1998; Watson 2001). Estes produtos atuam sobre os recetores do GABA, impedindo a entrada de íons cloro e, com isso, mantendo o impulso nervoso, levando à hiper-contracção muscular, paralisia e eventual morte (Hemingway & Ranson 2000; Braga & Valle 2007). A resistência por insensibilidade dos GABA-R foi associada a uma mutação de um único par de bases, ocasionando a substituição de um aminoácido (alanina por serina) (Braga & Valle 2007), não se conhecendo resistências ao espinosade associadas a este recetor.

1.3.5. Métodos para a detecção de resistências a inseticidas em larvas de mosquitos – Testes padronizados da OMS

Atualmente estão disponíveis vários métodos que permitem detetar a existência de resistências a inseticidas numa população de mosquitos – testes padronizados da OMS, testes de garrafa do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e teste por aplicação tópica, enquanto outros permitem diferenciar os mecanismos dessas resistências – ensaios bioquímicos e técnicas de biologia molecular. Nos programas de controlo vetorial, a necessidade de determinação da suscetibilidade a inseticidas de forma célere, leva a que os testes padronizados da OMS e os testes de garrafa do CDC sejam os de referência. Contudo, estes testes não permitem calcular com exatidão a dose necessária de inseticida que leva à morte do inseto (determinados nos ensaios de aplicação tópica) e os mecanismos envolvidos nessa resistência, como ocorre em testes bioquímicos ou de biologia molecular.

Os testes padronizados da OMS direccionados às formas larvares de mosquitos têm como principal objetivo determinar a suscetibilidade de uma determinada população de mosquitos a compostos utilizados como larvicidas. Os ensaios podem ser de dois tipos, os que pretendem determinar uma linha-de-base de resposta a um inseticida e aqueles que pretendem avaliar a resposta à concentração diagnóstico para detetar a resistência ao produto em teste.

No caso dos ensaios para a determinação da linha-de-base, grupos de 20 a 25 larvas em terceiro estado final e/ou quarto estado inicial são expostas a doses crescentes de um qualquer inseticida ou produto cujos efeitos larvicidas se pretenda avaliar por um período estipulado de tempo, preferencialmente num total de 100 larvas por dose.

No final do período de observação, as taxas de mortalidade por dose de inseticida são calculadas e submetidas a uma análise pelo método de *Finney* – análise *Probit*. A análise da regressão *Probit*, entre a dose de inseticida e mortalidade (Figura 18), permite determinar o nível de sensibilidade e a existência, ou não, de resistências na população larvar de mosquitos ao produto testado. A análise da reta obtida permite, também, estimar as concentrações letais correspondentes a 50% e 99% de mortalidade, CL_{50} e CL_{99} , respetivamente (WHO 1981).

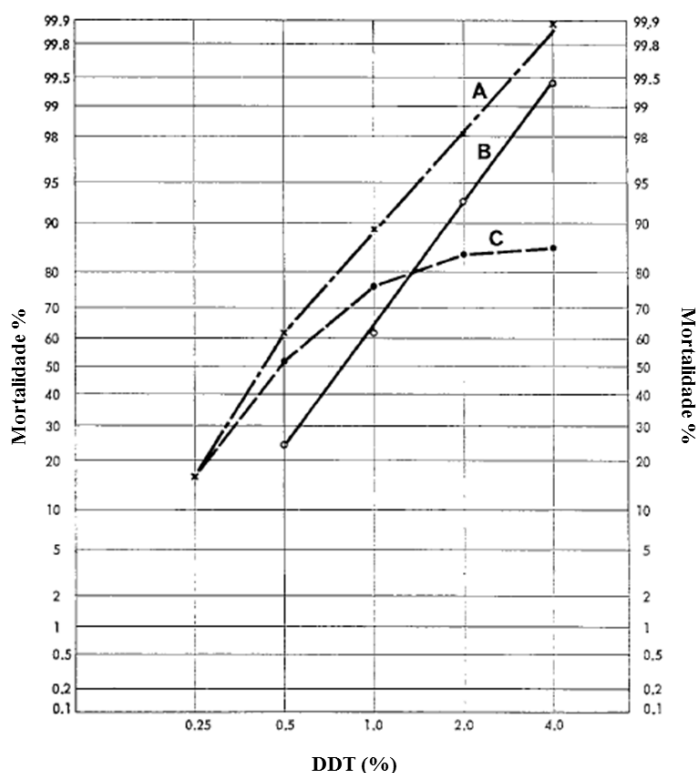


Figura 18: Linhas de regressão características de uma população suscetível (A), com variações sazonais ou tolerância (B) e resistente (C) (Adaptado de WHO 1970).

O estudo de uma população de referência, tida como suscetível, permite estimar a concentração diagnóstico para resistência, correspondendo esta a duas vezes a concentração letal 99% para a estirpe de referência. Estes ensaios devem ser realizados

em triplicado, preferencialmente em dias diferentes. A comparação das retas obtidas, para uma população suscetível e local, permite avaliar o grau de sensibilidade da população de campo ao inseticida testado (WHO 1970).

Nos testes de diagnóstico de resistência, larvas no mesmo estado que para o teste anterior são expostas a uma única dose ou concentração de diagnóstico, durante um período de tempo predefinido, comparando-se a mortalidade obtida com a da dose/concentração de diagnóstico (WHO 1970).

1.3.6. Resistências a inseticidas na população de *Aedes aegypti* na ilha da Madeira

Entre Julho de 2009 e Março de 2010, a suscetibilidade da população de *Aedes aegypti* a vários inseticidas químicos foi avaliada com recurso aos testes OMS tempo/concentração diagnóstico e garrafa CDC, direcionados às formas adultas.

De acordo com os testes OMS, *Aedes aegypti* é sensível ao malatão 5% com 99,0% de mortalidade, mas demonstrou ser resistente aos piretróides de síntese deltametrina 0,05% e permetrina 0,75% e ao organoclorado DDT 4%, com mortalidades de 65,2%, 33,3% e 29,4%, respetivamente.

Associada à resistência ao DDT, deltametrina e permetrina, foi identificada uma resistência do tipo *kdr*, por mutação do gene que codifica para os canais de sódio, local de ação do DDT e piretróides. A baixa frequência alélica (6,0%) sugere a existência de outros mecanismos que conferem resistência ao DDT e aos piretróides de síntese (Seixas 2012). Nos testes de garrafa CDC, a população de *Aedes aegypti* mostrou ser sensível à alfa-cipermetrina e ciflutrina (12,5µg/garrafa) produzindo, ambos os inseticidas, mortalidades de 100% (Seixas 2012).

Estes achados alertaram as autoridades locais para a problemática da resistência dos adultos de *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos, levando a que novas alternativas de controlo assentes em inseticidas biológicos e outros produtos não convencionais, comesçassem a ser investigados para futuras aplicações na ilha da Madeira.

2. OBJETIVOS

Desde da introdução de *Aedes aegypti* na cidade do Funchal em 2005, que as autoridades locais e seus parceiros, nacionais e internacionais, tentam controlar a sua densidade e expansão, seja por campanhas de educação para a saúde, seja por aplicação de inseticidas contra formas larvares ou adultas e gestão de possíveis criadouros das formas imaturas.

A expansão desde a cidade do Funchal pela costa sul da ilha da Madeira, a identificação de resistências a inseticidas piretróides de síntese e DDT, bem como o surto epidémico de dengue em 2012, com 2168 casos, obrigaram as autoridades locais a procurar novas ferramentas de controlo.

Deste modo, foi proposto no âmbito da Tese de Mestrado em Parasitologia Médica, lecionado no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – UNL, a exploração preliminar de ferramentas para o controlo direcionadas às formas larvares do mosquito *Aedes aegypti*, tendo-se traçado os seguintes objetivos.

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar a população de *Aedes aegypti* (L. 1762) da cidade do Funchal quanto à sua sensibilidade a substâncias presumivelmente larvicidas e avaliar se as mesmas levam a mudanças de comportamento das fêmeas durante a postura, avaliando a sua relevância como futuras ferramentas de controlo larvar.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar os níveis de sensibilidade das larvas de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal ao cloreto de sódio (sal) sob a forma de sal marinho de cozinha, espinosade (Spintor® 480 SC, 480g/L IA, Dow Agrosiences), *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Vectobac® G, 2.8% AI, 200UTI/mg) e piriproxifeno (PPF®; Padrão analítico >99%; lote SZBC220XV, Sigma-Aldrich) comparando-os com os da estirpe de referência Rockefeller em laboratório;

- Determinar se criadouros tratados com cloreto de sódio (sal), espinosade (Spintor® 480 SC, 480g/L IA, Dow Agrosciences), *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Vectobac® G, 2.8% AI, 200UTI/mg) e piriproxifeno (PPF®; Padrão analítico >99%; lote SZBC220XV, Sigma-Aldrich), levam a alterações de comportamento de postura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ilha da Madeira

A ilha da Madeira situa-se no oceano Atlântico (32°38'N / 32°52'N; 16°39'W / 17°16'W) a aproximadamente 900Km de Lisboa (Gonçalves et al. 2008) e a 500Km da costa do norte de África (Figura 19) (Sousa et al. 2012). É a principal e maior ilha da Região Autónoma da Madeira (RAM), a que pertencem também as ilhas do Porto Santo, das Desertas e das Selvagens. Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, a ilha da Madeira apresenta um clima do tipo temperado de verões secos e amenos, com pequenas variações de temperatura ao longo do ano, raramente abaixo dos 15°C no inverno e acima dos 25°C no verão, e com uma humidade relativa de 70% (Gonçalves et al. 2008; Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2011). Administrativamente a RAM encontra-se dividida em onze municípios: dez na ilha da Madeira e um na ilha do Porto Santo, com uma população total residente de 267.785 habitantes (hab.), dos quais 262.302 residem na ilha da Madeira e 5.483 na ilha do Porto Santo.

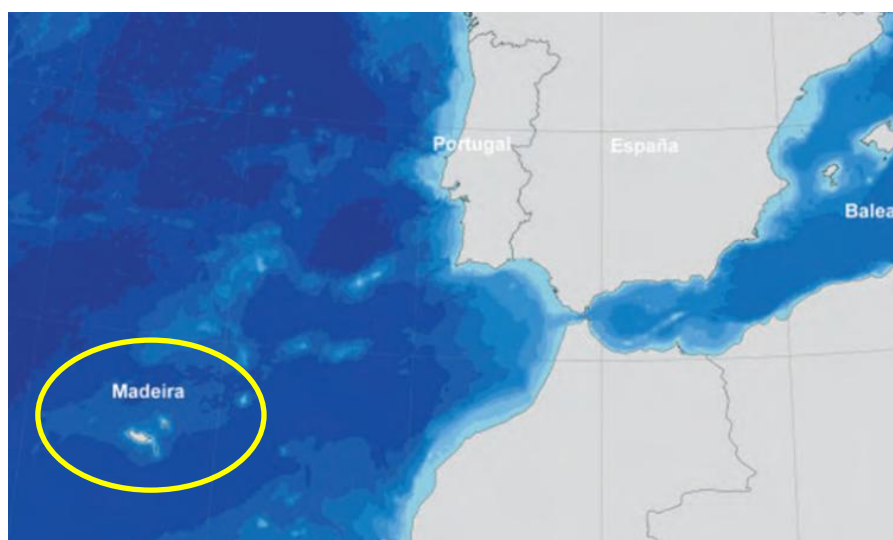


Figura 19: Enquadramento geográfico do arquipélago da Madeira (Adaptado de Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2011).

Localizada na costa sul da ilha da Madeira, encontra-se a capital e a maior cidade da RAM – a cidade do Funchal, com uma área de 76,15 Km² e 111.892 habitantes (cerca de 1.469,6 hab/Km²), albergando 41,8% da população da RAM.

A cidade do Funchal encontra-se dividida em dez freguesias: Imaculado Coração de Maria, Monte, Santa Luzia, Santa Maria Maior, Santo António, São Gonçalo, São Martinho, São Pedro, São Roque e Sé. Destas, a Freguesia de Santo António é a mais populosa com 27.383 residentes e a Freguesia da Sé a menos populosa com 2.656 residentes (INE 2012; Câmara Municipal do Funchal 2014).

3.2. Colónia de Mosquitos

Duas estirpes de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792) (Diptera: Culicidae) foram implementadas e mantidas nos insectários da Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural da RAM (DRADR RAM) e nos insectários do Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas (CEVDI) – INSA em condições ótimas de temperatura ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidade relativa ($70\pm 5\%$ HR) e fotoperíodo (12h/12h claro/escuro).

A estirpe de referência Rockefeller (EstRock) tem sido mantida em insectário desde 1930, estando assim livre de qualquer mecanismo de resistência a inseticidas (Kuno 2010). Esta colónia foi iniciada a partir de ovos cedidos pelo “*Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas*”. A colónia de estudo – estirpe Funchal (EstFx), foi obtida através dos ovos colhidos em armadilhas para posturas (*ovitrap*s) distribuídas pela cidade do Funchal, ou por prospeção de biótopos larvares neste mesmo município, entre as semanas 36 e 50 de 2013, pelas equipas da Unidade de Saúde Ambiental do IASAÚDE. Os ovos e as larvas colhidas foram enviados para os insectários da DRADR RAM após contagem e identificação morfológica.

Para ambas as colónias, os ovos foram imersos em tinas plásticas com água desclorada até à eclosão das larvas. Estas foram alimentadas com flocos para peixes de água fria Sera Goldy® (Sera, GmbH). Os adultos obtidos foram mantidos em gaiolas entomológicas e alimentados *ad libitum* com uma solução aquosa de açúcar a 10%. Duas a três vezes por semana, foi dada às fêmeas a oportunidade de realizarem alimentação sanguínea em *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) ou *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), estirpe BALB/c, previamente anestesiados por injeção intraperitoneal com uma solução combinada de xilazina (Rompun® 2%, Bayer, Canadá) e quetamina (Imalgene® 1000, Merial, Portugal), na proporção adequada à espécie e peso do animal (Hedenqvist & Hellebrekers 2003). A manipulação destes animais foi supervisionada e

efetuada de acordo com as normas do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC) e legislação nacional em vigor (Decreto-lei 129/92 de 2 de junho, Portaria nº100/92 de 23 de outubro). Os ovos das posturas da EstFx foram colhidos e usados para iniciar um novo ciclo até à geração F3 em gaiolas devidamente identificadas.

3.3. Inseticidas e outros compostos

Foram avaliados os seguintes produtos quanto ao seu efeito inseticida: cloreto de sódio (sal), sob a forma de sal marinho de cozinha adquirido numa superfície comercial e mantido bem fechado após aberto, de forma e evitar a sua degradação pela humidade; espinosade (Spintor® 480 SC, 480g/L IA, Dow Agrosiences) sob a forma de suspensão concentrada, cedido pelo Museu Municipal do Funchal; *Bti* (Vectobac® G, 2.8% AI, 200UTI/mg, Valent BioSciences), e piriproxifeno (PPF®; Padrão analítico >99%; lote SZBC220XV, Sigma-Aldrich).

3.4. Bioensaios de dose-resposta OMS

Para a caracterização da sensibilidade EstFx aos efeitos larvicidas do sal, espinosade e *Bti* e aos efeitos inibidores na emergência de adultos do piriproxifeno, foram realizados ensaios de dose-resposta de acordo com a metodologia descrita para formas larvares de mosquitos (WHO 1981; WHO 2005).

Estes consistiram na exposição de cinco grupos de 90 a 100 larvas, a cinco doses de cada um dos produtos em teste, divididas em quatro réplicas de 20 a 25 larvas de terceiro estado final e/ou quarto estado inicial, contidas em tinas de teste com 250 ml de água desclorada, produzindo entre 10 e 100% de mortalidade (M%) ou inibição da emergência de adultos (IE%), respetivamente, às 24 horas para os ensaios com sal, espinosade e *Bti* ou no final do período de observações para ensaios com o piriproxifeno. A IE% corresponde à percentagem de indivíduos que não atingiram o estado adulto em relação ao total de larvas expostas às doses de piriproxifeno. Cada ensaio foi realizado em triplicado em dias diferentes. O mesmo procedimento foi aplicado à EstRock num único ensaio constituído por cinco ou sete doses dos produtos em estudo. Os dados obtidos no final dos ensaios (larvas mortas e adultos não emergidos) foram sujeitos a uma regressão *Probit*, permitindo estimar as linhas-de-base

para as estirpes Rockefeller e Funchal e calcular as concentrações letais (CL) e as concentrações de inibição de emergência (CIE) que afetam 50% (CL/CIE₅₀) e 99% (CL/CIE₉₉) da população de mosquito em estudo. A utilização da EstRock permitiu a caracterização da EstFx quanto à presença de resistências ou tolerâncias aos produtos em estudo, por comparação das suas linhas-de-base e cálculo da Razão de Resistência (RR).

Previamente à realização dos ensaios de dose-resposta da OMS foram realizados ensaios de cariz exploratório permitindo, assim, definir o espectro de ação do sal, espinosade e *Bti*. Fora dos ensaios ficou o piriproxifeno. Os ensaios exploratórios e de dose-reposta decorreram nos insectários da DRADR RAM durante os meses de Setembro e Dezembro de 2013, com exceção dos ensaios com *Bti* para a EstRock, que se realizaram nos insectários do Centro de Estudo de Vetores e Doenças Infeciosas (CEVDI) – INSA durante o mês de Junho de 2014, respeitando-se os pressupostos de ambiente controlado: 26±2°C, 70±5%HR e fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro.

3.4.1. Bioensaios dose-resposta de fase exploratória

Os bioensaio de fase exploratória foram desenvolvidos com o intuito de determinar as doses inseticidas com mortalidades compreendidas entre os 10 e 100%. Estes foram desenvolvidos de acordo com a metodologia da OMS, previamente descrita em 3.4., com exceção do número de larvas expostas por dose, que variaram entres as 25 e 50 larvas. O ponto de partida para a seleção das concentrações salinas teve por base os trabalhos realizados durante o verão de 2012 no Funchal por investigadores do IHMT (Seixas, Novo et al. 2013). Na Tabela 1, são apresentados os compostos sujeitos aos testes exploratórios e as concentrações testadas.

Tabela 1: Inseticidas utilizados nos estudos exploratórios para definição dos intervalos de atividade e seleção das concentrações que produzem mortalidades entre os 10 e 100%.

Composto	EstRock	EstFx
	Concentração	Concentração
Sal (g/L)	10,0/11,0/12,0/ 13,0/ 14,0	10,0/ 11,52/ 12,52/ 13,0/ 16,0
Espinosade (mg/L)	0,003/ 0,008/ 0,013/ 0,03/ 0,05	0,0013/ 0,003/ 0,013/ 0,03/ 0,04/ 0,05/ 0,141/ 0,5
Bti (ml/L)	0,4/ 2,0/ 4,0/ 4,8/ 10,4	0,4/ 2,0/ 4,0/ 8,0/ 12,0

EstRock: Estirpe Rockefeller; EstFx: Estirpe Funchal

3.4.2. Bioensaios OMS de dose-resposta definitivos

Após a seleção das doses inseticidas nos ensaios exploratórios para o sal, espinosade e *Bti*, foram realizados os ensaios definitivos de dose-resposta, de acordo com o previamente exposto em 3.4, utilizando como controlo água desclorada ou etanol a 96% nos ensaios com PPF.

3.4.2.1. Perfil de suscetibilidade ao sal

O estudo do efeito larvicida do sal foi executado preparando-se as soluções salinas diretamente nas tinas de teste para um volume final de 250ml.

3.4.2.2. Perfil de suscetibilidade ao espinosade

As doses de teste foram preparadas a partir de concentrações seriadas com origem numa solução *stock* de 96 mg/L espinosade em água desclorada, descartadas ao fim de 24 horas por dúvidas quanto à estabilidade das soluções. A concentração de 0,5 mg/L espinosade corresponde ao valor máximo proposto pela OMS para tratamento de criadouros artificiais (WHOPES 2013).

3.4.2.3. Perfil de suscetibilidade ao *Bti*

Tratando-se de uma formulação comercial em grânulos, foi necessário proceder à dissolução do princípio ativo (*Bti*) durante 48 horas, por adição de 0,12g de Vectobac® G a um litro de água desclorada. A solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente, resguardada da luz e envolta em papel de alumínio. Ao fim de 48 horas a solução foi decantada e adicionada em diferentes volumes às tinas de teste, sendo o excedente da solução descartado.

Na Tabela 2 estão resumidas as doses inseticidas e as gerações da EstFx utilizadas nos ensaios, entre outras informações relevantes para a compreensão dos mesmos.

Tabela 2: Concentrações utilizadas para os ensaios de dose-resposta para as duas estirpes, o número de ensaios realizados por produto e a geração larvar da população do Funchal para a realização dos ensaios.

Larvicida	EstRock		EstFx		
	Dose	Rép. (n)	Dose	Geração larvar	Rép. (n)
Sal (g/L)	10,0/ 11,0/ 11,52/ 12,0/ 12,52/ 13,0/ 14,0	1	10,0/ 11,52/ 12,52/ 13,0/ 16,0	F1 / F2	3
Espinosade (mg/L)	0,008/ 0,010/ 0,013/ 0,015/ 0,038	1	0,02/ 0,03/ 0,04/ 0,05/ 0,5	F1 / F2	3
Bti (ml/L)	2,0/ 2,6/ 4,8/ 5,6/ 10,4	1	4,0/ 5,6/ 6,8/ 8,0/ 12,0	F1 / F2	3

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal

3.4.2.4. Perfil de suscetibilidade ao piriproxifeno – ensaios preliminares

Os ensaios realizados com o PPF foram de cariz preliminar, uma vez que só foi realizado um ensaio para a EstFx por exposição de cerca de 100 larvas, divididas em quatro réplicas constituídas por 20 a 25 larvas em quarto estado inicial às doses selecionadas. As doses de teste foram preparadas em 250ml de água desclorada a partir de diluições seriadas com origem numa solução *stock* de 4mg/L de piriproxifeno em etanol 96%. No Quadro 2 estão resumidas as doses de piriproxifeno utilizadas no ensaio. Devido ao modo de ação particular do PPF, estes ensaios podem levar vários dias, pelo que no decorrer dos ensaios foi adicionada água à medida que esta foi evaporando e flocos para peixes de água fria Sera Goldy® (Sera, GmbH) três vezes por semana. Os controlos foram constituídos por água e etanol 96% no volume igual ao retirado à solução de *stock* para constituição das soluções seriadas (Quadro 2). Para evitar fugas de adultos, as tinas de teste foram colocadas no interior de gaiolas entomológicas. O número de larvas, pupas e adultos mortos e vivos foi registado diariamente. Os adultos eram considerados vivos/totalmente emergidos quando apresentavam capacidade de voo. Os ensaios foram dados por concluídos após a emergência ou morte das larvas controlo e calculadas as IE% [Fórmula (3)], corrigidas se necessário pela Fórmula (4), a mortalidade larvar (percentagem de larvas mortas em relação às introduzidas nas tinas) e a mortalidade pupal (percentagem de pupas mortas em relação à soma das pupa mortas e adultos emergidos). Ambas as estirpes foram

expostas às mesmas concentrações de piriproxifeno e foram utilizadas larvas de geração F1 da EstFx.

Quadro 2: Concentrações de piriproxifeno selecionadas para os ensaios de dose-resposta para as estirpes Rock e Fx e volume de etanol 96% utilizado para a produção dos controles.

Piriproxifeno (mg/L)	Controlo
0,0	Água desclorada
0,00002	1,80 µl etanol 96%
0,00004	3,75 µl etanol 96%
0,00007	6,56 µl etanol 96%
0,00009	8,44 µl etanol 96%
0,005	469 µl etanol 96%

3.5. Estudos de oviposição

De forma a determinar se criadouros artificiais tratados com os produtos em estudo apresentariam estímulo atrativo ou repelente para fêmeas grávidas em busca de local de postura, foi realizado um ensaio com três ou seis réplicas, adaptado do trabalho de Santos e colaboradores (2010). Cada réplica foi constituída por uma gaiola entomológica (30x30x30cm), 23 a 36 fêmeas EstFx de 3 a 6 dias de idade e copos de postura tratados com um dos inseticidas ou com água (controlo). Às fêmeas foi dada a oportunidade de realizarem duas alimentações sanguíneas em *Mesocricetus auratus* ou *Mus musculus* (BALB/c), previamente anestesiados, durante 30 minutos, em três dias intercalados (descrito em 3.2.). No dia da segunda alimentação sanguínea, foram introduzidos nas gaiolas as tinas de postura, compostas por copos descartáveis de plástico de 100 ml revestidos interiormente com papel de filtro (*Whatman* nº5) em forma de cone, como suporte à oviposição. As tinas continham 50 ml da solução inseticida designada ou, no caso das tinas controlo, 50 ml de água. Na Tabela 3 são resumidos os inseticidas utilizados e as suas concentrações. Os copos foram dispostos em triângulo, para o espinosade, ou nos vértices mais afastados da manga da gaiola, para o sal, piriproxifeno e *Bti*. Ao fim de 24h os contentores de postura foram trocados por novos e alterada a sua posição rodando-os no sentido dos ponteiros do relógio ou invertendo a sua posição para o espinosade e para sal, *Bti* e piriproxifeno, respetivamente. Às 48 horas foram retirados os contentores de postura e a experiência

foi dada como terminada. Durante o decorrer dos ensaios foi fornecido *ad libidum* uma solução de açúcar a 10%. Antes da contagem dos ovos, os papéis de filtro foram deixados a secar à temperatura ambiente. A contagem foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio. Após a contagem os papéis de filtro foram descartados. No decorrer dos ensaios de sal com papel de filtro como suporte de postura, foi observado que este endurecia devido à cristalização de sal por evaporação de água. Deste modo foi realizado um ensaio adicional com três réplicas. Neste conjunto de ensaios o protocolo usado foi o mesmo, sendo a única alteração a remoção do papel de filtro das tinas de oviposição. Para a recolha desses ovos, as soluções foram filtradas em papel de filtro, permitindo sua contagem.

Os ensaios de atração ou repelência decorreram nos insectários da DRADR RAM durante os meses de setembro e dezembro de 2013, com exceção dos ensaios com *Bti* que se realizaram nos insectários do CEVDI – INSA durante o mês de julho de 2014, respeitando-se os pressupostos de ambiente controlado: $26\pm2^{\circ}\text{C}$, $70\pm5\%\text{HR}$ e fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro.

Tabela 3: Inseticidas utilizados nos testes de múltipla escolha para a determinação do efeito repelente ou de atração de inseticidas à oviposição.

	Tratamento	Concentração	Controlo	Total de Réplicas
Sal	Sem papel de filtro	16g/L [#]	Água	3
	Com papel de filtro	16g/L [#]	Água	6
Espinosade		0,1 mg/L ^{**}	Água	6
		0,5 mg/L ^{#, **}		
Piriproxifeno		0,01 mg/L ^{**}	Água	6
<i>Bti</i>		12ml/L [#]	Água	3

[#]Concentração que produziu 100% de M% nos ensaios larvares de dose-resposta para a EstFx; ^{**}Concentrações propostas pela OMS para tratamento de criadouros artificiais.

3.6.Tratamento e análise de dados

As mortalidades nos ensaios de sensibilidade aos larvicidas foram calculadas de acordo com a Fórmula (1); mortalidades entre os 5-20% nas tinas de controlo obrigaram à correção das mortalidades das tinas de teste pela fórmula de Abbott (2). As IE% nos, ensaios de sensibilidade ao piriproxifeno, foram calculadas pelas Fórmulas (3) e (4), respetivamente, se nas tinas de controlo se observaram emergências entre 95-100% e

80-95%. Os ensaios foram descartados sempre que nos controles foram registadas percentagens de pupação acima dos 10% ou mortalidades acima de 20%.

As análises estatísticas foram efetuadas com recurso ao *software* SPSS (v. 20, SPSS® Inc. Chicago, IL). Em todas as análises estatísticas foi estabelecido 0,05 como nível de significância (P). Rejeitaram-se as hipóteses nulas quando $P < 0,05$.

As CL/CIE_{50} e CL/CIE_{99} foram obtidas pela análise *Probit*: logaritmo da concentração *versus Probit* da mortalidade, utilizando-se as concentrações que produziram entre 10 e 100% de mortalidade ou inibição da emergência. Este método permite transformar uma curva dose-resposta sigmoide numa linha reta, podendo a adequação desta aos resultados observados ser analisada por meio de uma regressão de mínimos quadrados ou máxima verossimilhança (Finney 1971). O ajustamento ao modelo *Probit* foi analisado pelo teste de *Qui-quadrado de Pearson*, testando-se a hipótese nula, H_0 : *o modelo ajusta-se aos resultados observados*. As concentrações de diagnóstico ou discriminatórias foram calculadas como o dobro da CL_{99} obtida para a EstRock. A Razão de Resistência (RR) para os diferentes produtos, que define quantas vezes uma população local é resistente ao inseticida, foi calculada da pela Fórmula (5), considerando-se que uma população de mosquitos é suscetível quando $RR < 2$, parcialmente resistente ou tolerante quando $2 < RR < 5$ e resistente quando $RR > 5$ (Kamgang et al. 2011).

$$(1) M\% = \left(\frac{\text{nº de larvas mortas por dose inseticida}}{\text{total de larvas ensaiadas por dose inseticida}} \right) \times 100$$

$$(2) \text{Abbott} = \left(\frac{\% \text{ sobrevivência no controlo} - \% \text{ sobrevivência por dose inseticida}}{\% \text{ sobrevivência no controlo}} \right) \times 100$$

$$(3) IE\% = \left(\frac{\text{total de larvas expostas} - \text{adultos emergidos por dose inseticida}}{\text{total de larvas expostas}} \right) \times 100$$

$$(4) IE\%' = \left(\frac{IE\% \text{ teste} - IE\% \text{ controlo}}{100 - IE\% \text{ controlo}} \right) \times 100$$

$$(5) RR_{50/99} = \left(\frac{CL/CIE_{50/99} \text{ EstFx}}{CL/CIE_{50/99} \text{ EstRock}} \right)$$

Nos estudos de oviposição, por exposição de fêmeas grávidas aos diferentes inseticidas a unidade de estudo foi o número de ovos por fêmea. A análise estatística foi realizada às 24 e 48 horas. A normalidade dos dados foi determinada pelo teste *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade das variâncias determinada pelo teste de *Levene* (Maroco 2007). O teste de *ANOVA a um fator* foi utilizado para comparação do número médio de ovos por fêmea nos contentores de postura tratados com espinosade vs os contentores controlo (apenas com água). A hipótese de que o número de ovos por fêmea difere significativamente entre os contentores tratados com sal (com e sem papel de filtro) piriproxifeno e *Bti* e os contentores controlo (água) foi testada pelo *teste T para amostras independentes*, quando os pressupostos dos testes paramétricos se verificaram, ou pelo teste de *Mann-Whitney U*, quando essa situação não se observou.

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios dose-resposta de fase exploratória

O estudo exploratório permitiu determinar o espectro de ação dos produtos testados como larvicidas, permitindo a seleção de doses inseticidas necessárias para produzir mortalidades entre os 10 e os 100%. Nas Tabelas 4, 5 e 6 são apresentados os resultados destes ensaios.

Tabela 4: Resultados dos ensaios exploratórios para determinação do intervalo de ação do sal.

Sal (g/L)	Sal (%)	EstRock		EstFx	
		Larvas testadas	Mort. (%)	Larvas testadas	Mort. (%)
0,0 (controle)	0,0	25	0,0	25	0,0
10,0	1,0	25	8,0	25	12,0
11,0	1,10	25	32,0	-	-
11,52	1,15	-	-	25	40,0
12,0	1,20	25	68,0	-	-
12,52	1,25	-	-	25	76,0
13,0	1,30	25	92,0	25	92,0
14,0	1,40	25	100,0	-	-
16,0	1,60	-	-	25	100,0

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade

Tabela 5: Resultados dos ensaios exploratórios para determinação do intervalo de atividade do espinosade.

Espinosa de (mg/L)	EstRock		EstFx	
	Larvas testadas	Mort. (%)	Larvas testadas	Mort. (%)
0,0 (controle)	50	0,0	47	0,0
0,0013	-	-	25	0,0
0,003	50	2,0	25	4,0
0,008	25	16,0	-	-
0,013	50	58,0	25	12,0
0,03	50	100,0	46	34,8
0,04	-	-	48	66,6
0,05	50	100,0	50	86,0
0,141	-	-	49	98,0
0,5	-	-	50	100,0

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade

Tabela 6: Resultados dos ensaios exploratórios para a determinação do intervalo de ação do *Bti*.

<i>Bti</i> (ml/L)	EstRock		EstFx	
	Larvas testadas	Mort. (%)	Larvas testadas	Mort. (%)
0,0 (controlo)	50	0,0	25	0,0
0,4	50	0,0	25	0,0
2,0	50	16,0	25	0,0
4,0	50	30,0	25	32,0
4,8	75	60,0	-	-
8,0	-	-	25	80,0
10,4	75	100,0	-	-
12,0	-	-	25	100,0

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade

4.2. Bioensaos definitivos dose-resposta

As estirpes Rockfeller (EstRock) e Funchal (EstFx) foram testadas quanto à sua suscetibilidade ao sal, espinosade, *Bti* e piriproxifeno, de acordo com os bioensaos de dose-respostas (DR) propostos pela OMS para larvas de mosquitos. Nos ensaios de DR OMS foram testados um total de 2186 larvas EstRock e 4993 larvas da EstFx (Tabela 7).

Tabela 7: Total de larvas testadas nos ensaios DR OMS por produto e estirpe de *Aedes aegypti*.

Produto testado	EstRock	EstFx
	Larvas testadas	Larvas testadas
Sal	699	1501
Espinosade	500	1487
Bti	500	1498
Piriproxifeno	487	497
TOTAL	2186	4983

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade.

Não tendo sido registadas mortalidade no controlo, entre 5% e 20%, nos ensaios com sal, espinosade, *Bti* e PPF com a EstFx, as M% foram calculadas pela Fórmula (1). Por outro lado, nos ensaios da EstRock sujeita à ação do PPF foi observada 17% de mortalidade pelo que as M% das tinas de teste tiveram de ser corrigidas pela Fórmula (2). Para uma caracterização mais adequada das estirpes de *Aedes aegypti* Rockfeller e Funchal, quanto à sua suscetibilidade aos produtos em estudo, os resultados obtidos nos ensaios de dose-resposta foram sujeitos a análise pelo método *Probit*.

4.2.1. Perfil de suscetibilidade ao sal

Por análise da Tabela 8 e Figura 20, é possível observar que as duas estirpes têm um comportamento semelhante quando expostas a concentrações salinas crescentes e que a mortalidade larvar está positivamente relacionada com concentrações crescentes de salinidade. A análise do *Probit* estimou para EstRock uma CL₅₀ de 11,28g/L sal e CL₉₉ de 13,63g/L de sal e para a EstFx uma CL₅₀ e CL₉₉ de, respetivamente, 11,30g/L e 14,68g/L de sal (Tabela 13; Anexo 1). A sobreposição dos intervalos de confiança a 95% na CL₅₀ e CL₉₉ sugerem que a EstRock e a EstFx são semelhantes fenotipicamente. Partindo da CL₉₉ da EstRock, foi calculada como concentração diagnóstico 27,26g/L de sal.

Tabela 8: Resultado dos ensaios dose-resposta de sensibilidade larvar das estirpes Rockfeller e Funchal ao sal.

Sal (g/L)	EstRock			EstFx		
	Larvas testadas	Mort. (nº larvas)	Mort. (%)	Larvas testadas	Mort. (nº larvas)	Mort. (%)
0,0 (controlo)	100	0	0	296	0	0,0
10,0	99	11	11,1	300	49	16,3
11,0	100	36	36,0	-	-	-
11,52	100	49	49,0	300	152	50,7
12,0	100	80	80,0	-	-	-
12,52	100	91	91,0	300	247	82,3
13,0	100	98	98,0	301	275	91,4
14,0	100	100	100,0	-	-	-
16,0	-	-	-	300	300	100,0

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade.

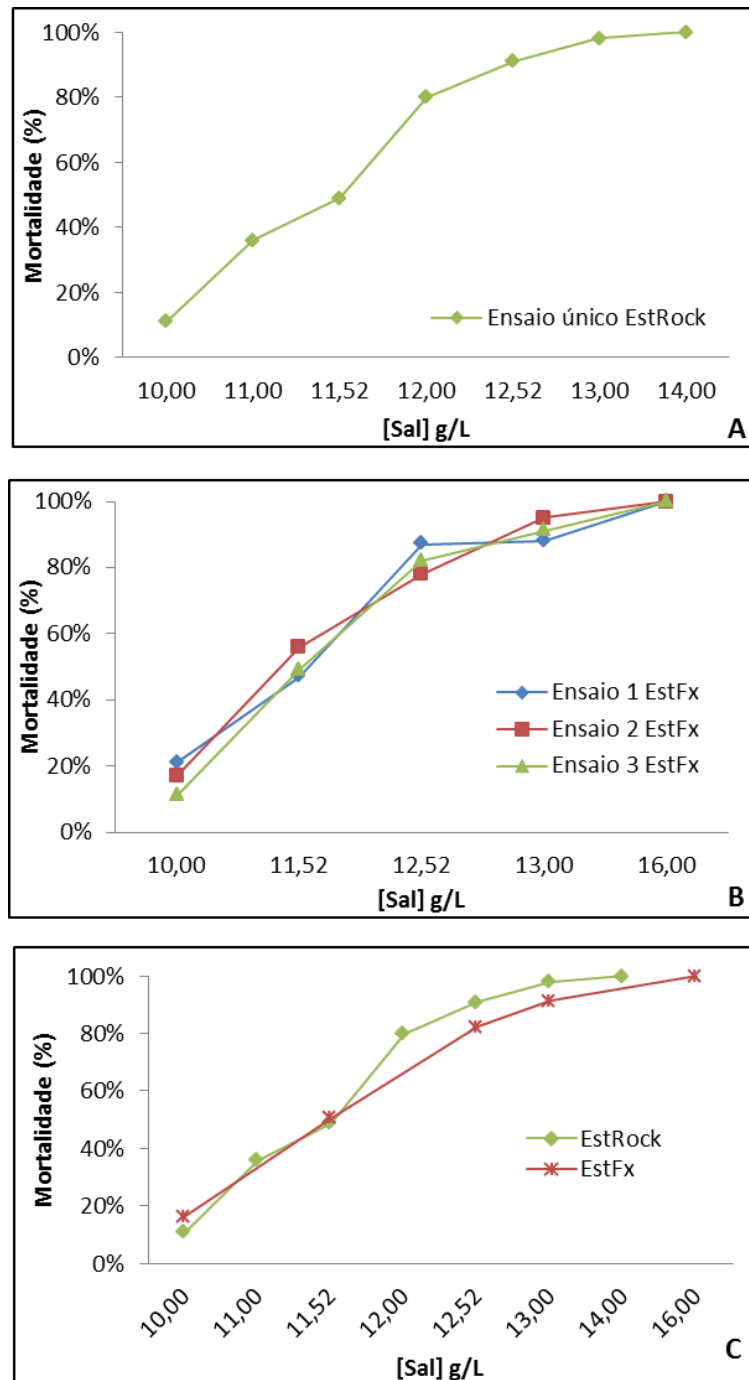


Figura 20: Percentagem das mortalidades larvares observadas ao longo dos ensaios de dose-resposta OMS por exposição ao sal. (A) Ensaio dose-resposta com larvas EstRock. (B) Ensaios dose-resposta com larvas EstFx. (C) Comparação das mortalidades observadas nas estirpes.

4.2.2. Perfil de suscetibilidade ao espinosade

A observação dos resultados dos ensaios dose-resposta expressos na Tabela 9 e Figura 21, é indicativa de que a estirpe de referência e a população da cidade do Funchal têm comportamentos diferentes quando expostas ao espinosade (Spintor® 480 SC), com a EstFx sensível a concentrações de espinosade mais elevadas que a EstRock (Figura 21; C). Embora nos bioensaios de fase exploratória com EstFx se terem atingido mortalidades de 98% com 0,141mg/L, optou-se por utilizar a dose máxima proposta pela OMS garantindo-se, desta forma, 100% de mortalidade em todos os ensaios de dose-resposta. A análise *Probit* dos resultados obtidos nos ensaios de DR para a EstRock estimou uma CL₅₀ e CL₉₉ de 0,011mg/L e 0,027mg/L de espinosade, respetivamente, permitindo calcular a concentração diagnóstico em 0,054mg/L de espinosade (Tabela 13; Anexo 1). Por outro lado, a análise *Probit* dos resultados obtidos nos ensaios de DR da EstFx, mostra que o modelo não se adequa aos dados ($\chi^2=22,90$; $P<0,05$) (Anexo 1), rejeitando-se a hipótese nula e levando a que os valores estimados para a CL₅₀ e CL₉₉ não possam ser, de fato, considerados válidos.

Tabela 9: Resultados dos ensaios dose-resposta de sensibilidade larvar das estirpes Rockfeller e Funchal ao espinosade.

Espinosa (mg/L)	EstRock			EstFx		
	Larvas testadas	Mort. (nº larvas)	Mort. (%)	Larvas testadas	Mort. (nº larvas)	Morta. (%)
0,0 (controlo)	100	1	1,0	198	0	0,0
0,008	100	13	13,0	-	-	-
0,010	100	46	46,0	-	-	-
0,013	100	66	66,0	-	-	-
0,015	100	73	73,0	-	-	-
0,038	100	100	100,0	-	-	-
0,02	-	-	-	296	33	11,1
0,03	-	-	-	297	61	20,5
0,04	-	-	-	297	174	58,6
0,05	-	-	-	297	233	78,5
0,5	-	-	-	300	300	100,0

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade.

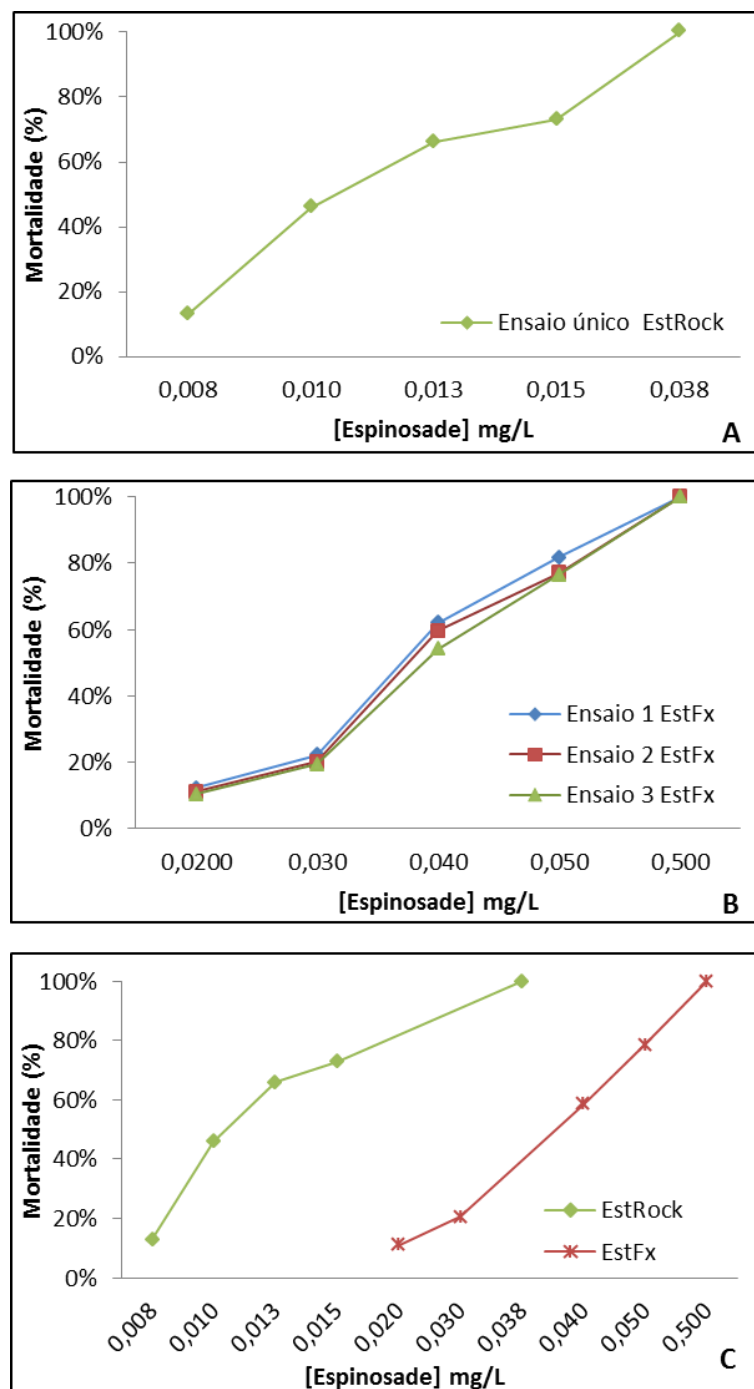


Figura 21: Percentagem das mortalidades larvares observadas ao longo dos ensaios de dose-resposta OMS por exposição ao epsinosade. (A) Ensaio dose-resposta com larvas EstRock. (B) Ensaios dose-resposta com larvas EstFx. (C) Comparação das mortalidades observadas nas estirpes.

4.2.3. Perfil de suscetibilidade ao *Bti*

Os resultados obtidos nos ensaios de dose-resposta por exposição das duas estirpes de *Aedes aegypti* ao *Bti* (Tabela 10) sugerem que a população da cidade do Funchal é suscetível ao *Bti* na sua formulação comercial Vectobac® G, demonstrando um padrão de resposta semelhante à EstRock, embora a EstFx seja suscetível a doses mais elevadas (Figura 22). Para a EstRock e EstFx, foi estimada, pelo método *Probit*, a CL₅₀ de 3,68 e 4,2ml/L e a CL₉₉ de 14,01 e 10,2ml/L, respetivamente (Tabela 13; Anexo 1). A concentração diagnóstico foi estimada em 28,02ml/L de suspensão de *Bti*, partindo de duas vezes a CL₉₉ da EstRock.

Tabela 10: Resultados dos ensaios dose-resposta de sensibilidade larvar das estirpes Rockfeller e Funchal ao *Bti*.

<i>Bti</i> (ml/L)	EstRock			EstFx		
	Larvas testadas	Mort. (nº larvas)	Mort. (%)	Larvas testadas	Mort. (nº larvas)	Mort. (%)
0,0 (controlo)	100	1	1,0	225	0	0
2,0	100	16	16,0	-	-	-
2,6	100	31	31,0	-	-	-
4,0	-	-	-	298	142	47,7
4,8	100	60	60,0	-	-	-
5,6	100	75	75,0	300	220	73,3
6,8	-	-	-	300	266	88,7
8,0	-	-	-	300	291	97,0
10,4	100	100	100,0	-	-	-
12,0	-	-	-	300	300	100,0

EstRock: Estirpe Rockfeller; EstFx: Estirpe Funchal; Mort: mortalidade.

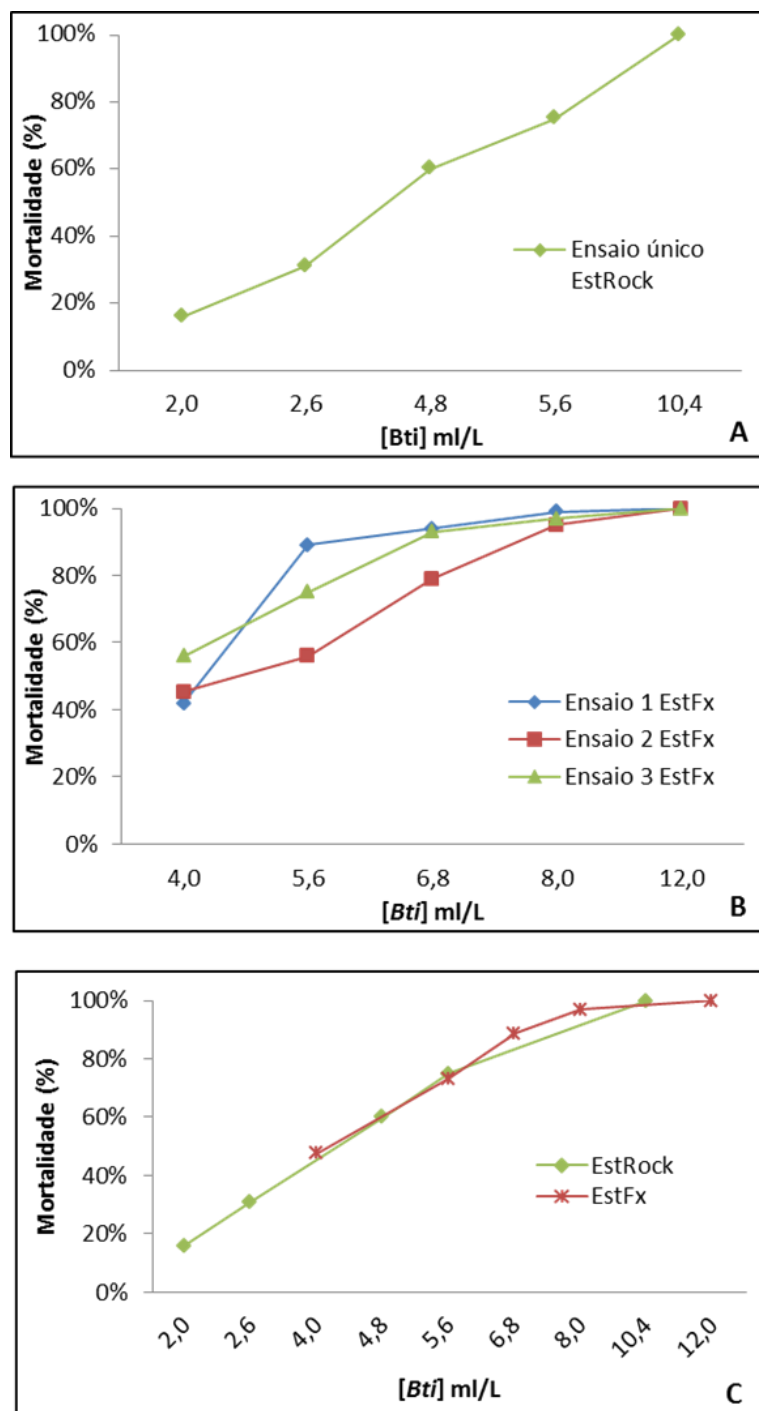


Figura 22: Percentagem das mortalidades larvares observadas ao longo dos ensaios de dose-resposta OMS por exposição ao *Bti*. (A) Bioensaio dose-resposta com larvas EstRock. (B) Bioensaios dose-resposta com larvas EstFx. (C) Comparação das mortalidades observadas nas estirpes.

4.2.4. Perfil de suscetibilidade ao piriproxifeno – Ensaio preliminares

Os ensaios com PPF podem ser considerados como preliminares, uma vez que foi realizado apenas um ensaio de suscetibilidade da EstFx ao PPF. Em média, os ensaios de exposição das estirpes Rockfeller e Funchal ao PPF tiveram uma duração de 11 dias. A observação dos resultados descritos nas Tabelas 11 e 12 e Figura 23 sugerem que as estirpes estudadas apresentam comportamentos distintos quando expostas ao PPF. A mortalidade larvar para ambas as estirpes foi inferior a 5% em todas as doses de PPF, com exceção da concentração de 0,005mg/L PPF que produziu uma mortalidade larvar na EstRock de 16,9%. O efeito pupicida é observado em todas as concentrações de PPF para ambas as estirpes, embora com maior impacto na EstRock.

A análise *Probit* realizada sobre os resultados obtidos nos ensaios com a EstFx, mostrou haver uma relação de linear entre as variáveis ($\chi^2=3,641$; $P=0,303$), permitindo obter as CIE₅₀ CIE₉₉ estimadas em 7×10^{-5} e 9×10^{-4} mg/L PPF, respetivamente (Tabela 14; Anexo 1). Por outro lado a análise *Probit* mostrou não haver uma relação linear entre o logaritmo da dose de PPF e o *Probit* da mortalidade para a EstRock ($\chi^2=14,63$; $P<0,05$) (Tabela 14; Anexo 1), o que impediu a caracterização da população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal quanto à presença ou ausência de resistência ao PPF.

Tabela 11: Resultados dos ensaios DR de suscetibilidade larvar aos efeitos da inibição de emergência do PPF sobre a estirpe Rockfeller.

Piriproxifeno (mg/L)	Larvas ensaiadas (n)	Ad. emergidos (n)	IE%	IE%'	Mort. larvar (%)	Mort. pupal (%)
0 (controlo)	153	127	16,9 ^Y	-	0,7	4,2
0,00002	99	59	40,4	28,2	0,0	20,3
0,00004	99	45	54,5	45,2	3,0	38,4
0,00007	102	18	82,4	78,8	3,9	76,0
0,00009	91	1	98,9	98,7	3,3	98,6
0,005	96	0	100,0	100,0	19,8	100,0

Ad: Adultos; Mort: Mortalidade Y: IE% entre os 5 e 20% no controlo necessitam ser corrigidos pela Fórmula 4

Tabela 12: Resultados dos ensaios de suscetibilidade larvar aos efeitos da inibição de emergência do PPF sobre a estirpe Funchal.

Piriproxifeno (mg/L)	Larvas ensaiadas (n)	Ad. emergidos (n)	IE%	Mort. larvar (%)	Mort. pupal (%)
0 (controlo)	149	143	-	0,0	0,0
0,00002	99	86	13,13	1,0	2,3
0,00004	99	60	39,39	0,0	14,3
0,00007	99	53	46,46	0,0	33,8
0,00009	100	36	64,0	1,0	43,8
0,005	100	0	100,0	1,0	100,0

Ad: Adultos; Mort: Mortalidade

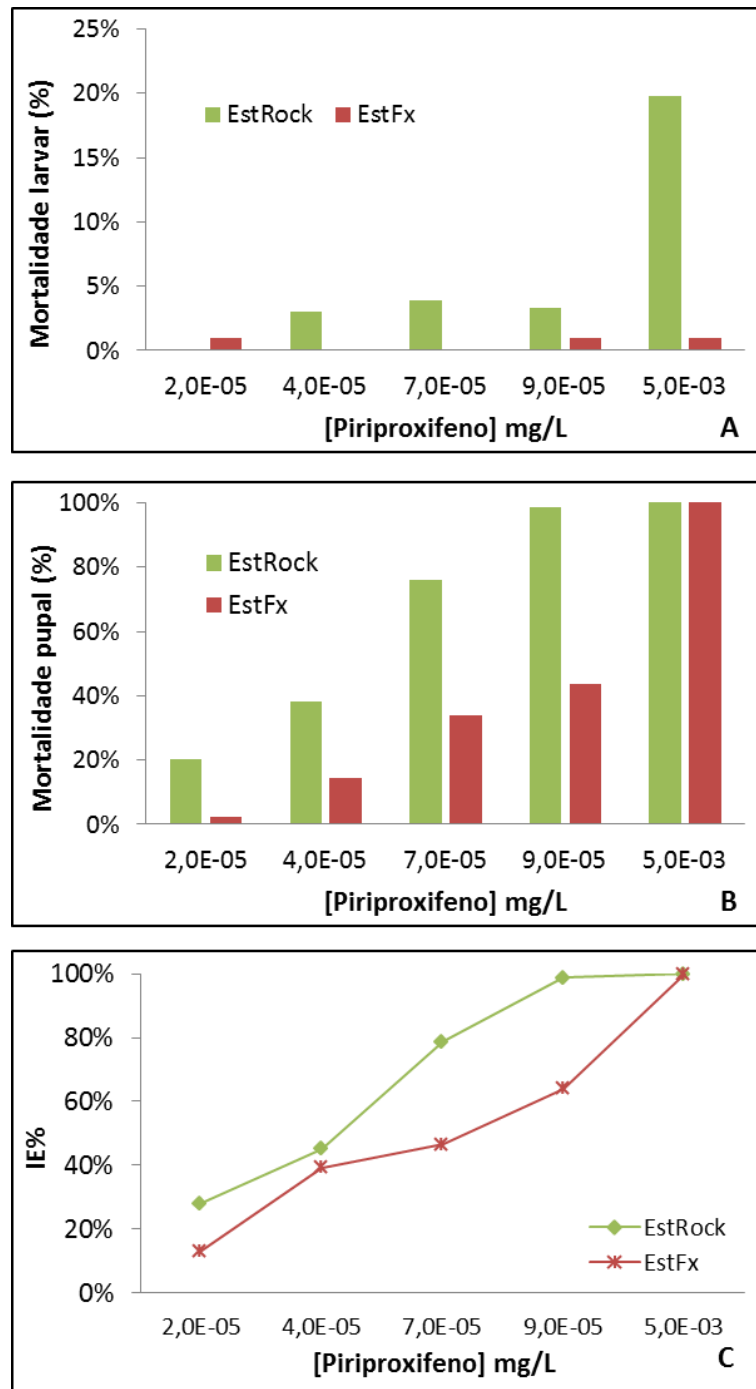


Figura 23: Efeito larvicidas (A), pupicida (B) e inibição da emergência de adultos (C), observado ao longo do ensaio de dose-resposta OMS por exposição de larvas de *Aedes aegypti* das estirpes Rock e Fx ao PPF.

Tabela 13: Resultados da análise do modelo *Probit* e Razão de Resistência, para as estirpes Rockfeller e Funchal, quanto aos efeitos larvicidas do sal, espinosade e *Bti*.

Larvicida	Estirpe	LC ₅₀ (95% IC)	LC ₉₉ (95% IC)	Equação	χ^2	P*	RR ₅₀	RR ₉₉
Sal (g/L)	Rock	11,28 (11,10-11,50)	13,63 (13,14-14,45)	Y=33,33X-34,83	10,01	0,075 ^a	-	-
	Fx.	11,30 (10,98-11,58)	14,68 (13,95-15,93)	Y=20,83X-21,83	7,74	0,052 ^a	1,00	1,08
Espinosade (mg/L)	Rock	0,011 (0,010-0,013)	0,027 (0,020-0,063)	Y=6,67X+12,75	6,16	0,104 ^a	-	-
	Fx.	0,037 (0,032-0,045)	0,100 (0,069-0,290)	Y=6,25X+9,13	22,90	0,000	nc	nc
Bti (ml/L)	Rock	3,68 (2,95-4,50)	14,01 (9,33-34,68)	Y=4X-2,2	7,53	0,057 ^a	-	-
	Fx.	4,2 (3,64-4,62)	10,2 (8,68-13,55)	Y=6,25X-4,25	6,74	0,081 ^a	1,14	0,73

*P<0,05 indica um modelo inválido, P>0,05 sugere um modelo bem ajustado; ^apara valores de significância inferiores a 0,150 um fator de heterogeneidade é utilizado para calcular os intervalos de confiança a 95%; -: sem significado; nc: não calculado.

Tabela 14: Resultados da análise *Probit* e Razão de Resistência, para as duas estirpes Rockefeller e Funchal, quanto ao efeito na inibição da emergência provocado pelo PPF.

Larvicida	Estirpe	CIE ₅₀ (95% IC)	CIE ₉₉ (95% IC)	Equação	χ^2	P*	RR ₅₀	RR ₉₉
PPF (mg/L IA)	Rock	3,5e⁻⁵ (1,5e ⁻⁵ – 5,4e ⁻⁵)	1,8e⁻⁴ (9,3e ⁻⁴ - 9e ⁻³)	Y=5,71X+27,86	17,68	0,001	-	-
	Fx.	7e⁻⁵ (6e ⁻⁵ - 8e ⁻⁵)	9e⁻⁴ (5e ⁻⁴ - 3e ⁻³)	Y=2,86X+11,93	3,64	0,303 ^a	nc	nc

*P<0,05 indica um modelo inválido, P>0,05 sugere um modelo bem ajustado; ^apara valores de significância inferiores a 0,150 um fator de heterogeneidade é utilizado para calcular os intervalos de confiança a 95%; -: sem significado; nc: não calculado.

4.3. Estudos de oviposição

Nas Tabelas 15, 16, 17, 18 e 19 são apresentados os resultados dos ensaios de oviposição às 24 e 48 horas e os respectivos valores de significância, obtidos nos testes estatísticos utilizados para detetar a existência de diferenças entre as médias de número de ovos/fêmea nos criadouros. Com exceção dos ensaios com sal sem papel de filtro como suporte de postura e dos ensaios com *Bti* (Tabelas 15 e 18), foram observadas mortes nas fêmeas em ensaio, das 24 horas para as 48 horas, em todos os outros produtos avaliados.

Em ambos os ensaios com sal, os contentores tratados com 16g/L de sal receberam um número médio de ovos por fêmea significativamente menor comparado com o controlo ($P < 0,05$) (Tabela 15 e 16; Anexo 2), tanto às 24 como 48 horas, sugerindo um efeito dissuasor para a oviposição.

Nos restantes produtos testados, espinosade, *Bti* e PPF, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o número médio de ovos por fêmea nos criadouros tratados em relação ao controlo, tanto às 24 como 48 horas ($P > 0,05$), sugerindo que nenhum dos compostos apresenta propriedades dissuasoras ou atraentes para fêmeas grávidas (Tabelas 17, 18 e 19; Anexo 2). Nos ensaios com espinosade, às 24 e 48 horas, o número médio de ovos/fêmea é superior no contentor tratado com espinosade 0,5mg/L, em relação ao contentor tratado com 0,1mg/L. Esta diferença poderá indicar alguma capacidade de atração do espinosade na dose mais elevada, embora estatisticamente não haja diferenças significativas ($P > 0,05$) (Tabela 17; Anexo 2). Nos ensaios com recurso ao *Bti*, foi observado que nas 24 horas após a segunda alimentação sanguínea, o número médio de ovos por fêmea foi muito reduzido, pelo que o ensaio foi prolongado até às 72 horas.

Tabela 15: Resultados do ensaio de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao sal sem papel de filtro.

Tratamento (controlo vs. tratamento)		Rép	Total (fêmeas)	$\bar{\varphi}/\text{Rép} \pm \text{dp}$	Ovos	$\overline{\text{Ovos}}/\varphi \pm \text{dp}$	P*
24h	Água	3	73	24,33±1,16	753	10,16±5,14	0,037
	Sal 16g/L				59	0,79±1,22	
48h	Água	3	73	24,33±1,16	273	3,84±3,1	-
	Sal 16g/L				0	0,0±0,0	

Rép: número de réplicas realizadas; dp: desvio padrão da média; * *Teste T* a nível de significância 0,05; - não determinado.

Tabela 16: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao sal com papel de filtro.

Tratamento (controlo vs. tratamento)		Rép	Total (fêmeas)	$\bar{\varphi}/\text{Rép} \pm \text{dp}$	Ovos	$\overline{\text{Ovos}}/\varphi \pm \text{dp}$	P*
24h	Água	6	194	32,3±1,2	400	2,06±1,58	0,004
	Sal 16g/L				9	0,045±0,1	
48h	Água	6	188	31,3±2,3	199	1,06±0,83	0,026
	Sal 16g/L				25	0,13±0,31	

Rép: número de réplicas realizadas; dp: desvio padrão da média; * *Teste de Mann-Whitney U* a nível de significância 0,05.

Tabela 17: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao espinosade.

Tratamento (controlo vs. tratamento)		Rép	Total (fêmeas)	$\bar{\varphi}/\text{Rép} \pm \text{dp}$	Ovos	$\overline{\text{Ovos}}/\varphi \pm \text{dp}$	P*
24h	Água	6	201	33,5±1,2	172	0,86±0,97	0,750
	Espinosade 0,1mg/L				184	0,91±0,60	
	Espinosade 0,5mg/L				235	1,17±0,70	
48h	Água	6	198	33,0±1,5	396	1,97±1,15	0,338
	Espinosade 0,1mg/L				209	1,05±0,8	
	Espinosade 0,5mg/L				325	1,63±1,18	

Rép: número de réplicas realizadas; dp: desvio padrão da média; * *Teste de ANOVA um fator* a nível de significância 0,05.

Tabela 18: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao *Bti*.

Tratamento (controle vs. tratamento)		Rép	Total (fêmeas)	$\bar{\varphi}/\text{Rép} \pm \text{dp}$	Ovos	$\overline{\text{Ovos}}/\varphi \pm \text{dp}$	P
24h	Água	3	90	30±0,0	6	0,07±0,12	1,00*
	<i>Bti</i> 12ml/L				2	0,02±0,04	
48h	Água	3	90	30±0,0	59	0,66±0,93	0,452#
	<i>Bti</i> 12ml/L				132	1,47±1,4	
72h	Água	3	90	30±0,0	107	1,19±0,97	0,200*
	<i>Bti</i> 12ml/L				7	0,07±0,11	

Rép: número de réplicas realizadas; dp: desvio padrão da média; * *Teste de Mann-Whitney U*; # *Teste T* a nível de significância 0,05.

Tabela 19: Resultados do efeito de repelência ou atração de fêmeas grávidas da estirpe Funchal ao piriproxifeno.

Tratamento (controle vs. tratamento)		Rép	Total (fêmeas)	$\bar{\varphi}/\text{Rép} \pm \text{dp}$	Ovos	$\overline{\text{Ovos}}/\varphi \pm \text{dp}$	P
24h	Água	6	174	29,0±5,3	568	3,23±1,23	0,720*
	PPF 0,01 mg/L				496	2,88±1,96	
48h	Água	6	171	28,5±5	289	1,88±2,03	0,699#
	PPF 0,01mg/L				349	1,99±1,32	

Rép: número de réplicas realizadas; dp: desvio padrão da média; * *Teste T*; # *Teste de Mann-Whitney U* a nível de significância 0,05.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Desde o primeiro registo do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) na cidade do Funchal, em 2005 (Margarita et al. 2006), que as autoridades regionais e nacionais têm demonstrado preocupação pela presença desta espécie na ilha, uma vez que esta se trata de um comprovado vetor de arboviroses (Murray et al. 2006). A vigilância entomológica e o controlo direcionado a *Aedes aegypti* foram prontamente iniciados pelas autoridades locais, através da implementação de uma rede de *ovitrap*s (Gonçalves et al. 2008) e de campanhas de educação para a saúde, redução de criadouros e aplicação de inseticidas contra formas larvares e adultas (Almeida et al. 2007).

Embora a dedicação das autoridades regionais, nacionais e estrangeiras no combate a *Aedes aegypti*, em Setembro de 2012 teve início um surto de dengue na ilha da Madeira, que se prolongou até início de Março de 2013, com registo de 2168 casos (DGS 2013b).

Sendo a aplicação de inseticida um dos principais pilares do controlo de *Aedes aegypti*, foram realizados estudos de sensibilidade a várias classes de inseticidas de possível utilização no controlo das formas adultas. Estes revelaram a presença de resistência aos piretróides de síntese, permetrina e deltametrina, e ao organoclorado DDT por mecanismos de resistência *kdr* (Seixas 2012).

Atualmente nos programas de controlo de mosquitos é dada cada vez mais relevância à utilização de inseticidas ecologicamente seguros, com baixo impacte no meio ambiente e nas espécies não-alvo e, ao mesmo tempo, com elevados níveis de eficácia. Na Europa, este princípio foi formalizado pela “Diretiva Biocidas 98/8”, que enuncia a gradual redução no uso de inseticidas da família dos organoclorados, organofosforados e carbamatos nos programas de saúde pública, levando à limitação das intervenções das unidades europeias de controlo de mosquitos (União Europeia 1998; Darriet et al. 2010). À luz destes conhecimentos, foi proposto para este trabalho o estudo de inseticidas não convencionais e outros produtos direcionados à eliminação das formas larvares de *Aedes aegypti*.

O estudo da suscetibilidade de uma população culicídea a inseticidas, deve ser o primeiro passo em qualquer campanha de controlo assente na aplicação de inseticidas químicos ou biológicos, permitindo determinar a presença de resistências e atuar mediante os resultados (WHO 1981).

Neste âmbito, foram avaliados quatro produtos passíveis de serem utilizados na ilha da Madeira como ferramentas para o controlo das formas imaturas de *Aedes aegypti*. Este trabalho trata-se do primeiro estudo de caracterização da sensibilidade da população larvar de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal aos biolarvicidas *Bti* (Vectobac® G) e espinosade (Spintor® 480 SC), ao RCI piriproxifeno (PPF®; Padrão analítico >99%; lote SZBC220XV, Sigma-Aldrich) e ao cloreto de sódio (sal marinho de cozinha), recorrendo-se para tal aos bioensaios dose-resposta padronizados da OMS.

5.1. Utilização de sal como larvicida para *Aedes aegypti* da ilha da Madeira

Nos testes de DR OMS com sal, os resultados obtidos sugerem que este pode ser uma alternativa sustentável e ecológica aos larvicidas de uso tradicional, para aplicação em estruturas fixas de captação ou acumulação de águas, em especial valas de drenagem, sarjetas, “ralos” de jardim, ou outro tipos de estruturas onde se possa acumular água, não reutilizada para rega, consumo humano ou animal.

Embora já se tenha observado a presença de larvas de *Aedes aegypti* em criadouros artificiais no Sri Lanka, com concentrações salinas entre os 2 e os 10g/L de sal (Jude et al. 2012), os nossos resultados indicam que concentrações iguais ou superiores a 16g/L produzem 100% de mortalidade, ao fim de 24 horas, em laboratório. Ainda que se desconheça, na atualidade, a salinidade dos biótopos das larvas de *Aedes aegypti* da região, os resultados sugerem que modificações na salinidade dos criadouros podem ser suficientes para as eliminar.

Foi também avaliada a capacidade dissuasora da oviposição produzida pelo sal, ficando demonstrado que as fêmeas preferem realizar as suas posturas nos recipientes livres de sal na concentração ensaiada (16g/L de sal), razão pela qual este composto é recomendado para tratamento de recipientes suscetíveis de serem utilizados como locais de postura de mosquitos do género *Aedes* (Tilak et al. 2005).

Na cidade do Funchal foi observado que sarjetas, ralos (ECDC 2013) e orifícios para introdução de postes (observações no terreno não publicadas), servem como criadouro das formas imaturas de *Aedes aegypti*. A aplicação de sal nestes locais pode ser uma medida operacionalmente simples, barata e exequível, concretizável pelos habitantes locais, sob orientação das autoridades competentes. Pode de igual modo ser aplicável pelas autoridades locais para controlo da densidade de mosquitos na época do ano em que esta é mais elevada, ou como medida de emergência em caso de um novo surto arboviral.

Após a aplicação do sal, a sua capacidade dissuasora deve ser tida em consideração. Fêmeas das áreas intervencionadas, na impossibilidade de realizarem posturas nesses criadouros, podem deslocar-se para áreas anteriormente não infestadas por *Aedes aegypti*, ou começarem a explorar outros criadouros pouco habituais. Esta situação poderá ser solucionada, por exemplo, pela colocação nas proximidades dos criadouros sujeitos ao tratamento com sal de armadilhas letais direcionadas a fêmeas que procuram locais de postura. Por outro lado, a capacidade dissuasora do sal, pode ser utilizada como ferramenta eficaz em campanhas de controlo por manipulação ambiental, prevenindo o acesso das fêmeas a criadouros não removíveis, como as sarjetas e ralos. Outra opção será a adequação do calendário de aplicação do sal. Este deverá ser aplicado não antes do início da época de reprodução da população local de *Aedes aegypti*, mas sim quando as sarjetas e outras estruturas de contenção de água não amovíveis já se encontrem colonizadas por formas larvares desta espécie. Deste modo, estar-se-á a contribuir para a diminuição das densidades dos imagos e, consequentemente a reduzir o risco de ocorrência de um novo surto de doença arboviral.

5.2. Utilização de Espinosade (Spintor® 480 SC), como larvicida para *Aedes aegypti* da ilha da Madeira

Em relação espinosade (Spintor® 480 SC), os resultados obtidos sugerem que a população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal poderá ser resistente a este produto, devido à não adequação do modelo *Probit* aos dados observados (Finney 1971) (ver Anexo 1). Contudo, os resultados dos ensaios DR (Figura 21:C) apontam para a presença de uma população tolerante (WHO 1970), uma vez que se atingiu mortalidades de 100%.

Estes resultados são diametralmente opostos aos obtidos em vários trabalhos de laboratório (Bond et al. 2004; Darriet et al. 2005) e de campo (Pérez et al. 2007; Thavara et al. 2009; Marina et al. 2011) que sugerem o espinosade como um potencial biocida direcionado às formas larvares de mosquitos. Porém, os nossos resultados vão de encontro aos obtidos em outros trabalhos que demonstram, em outras ordens de insetos e diferentes espécies de mosquitos, a presença de resistências ao espinosade em grau variado. No Havai foi registada uma população de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), importante praga em culturas agrícolas, com elevado grau de resistência ($RR > 100$) apenas 2,5 anos após contacto com espinosade (Zhao et al. 2002). Em culicídeos foram registadas resistências em populações de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) selecionadas em laboratório (Su e Cheng 2012, 2014a, 2014b) e em *Aedes albopictus* numa região agrícola do Paquistão (Khan et al. 2011). Neste último caso, os autores associam a resistência ($23 < RR < 50$) à utilização do espinosade como fitofármaco e não por aplicação direcionada às larvas de *Aedes albopictus*.

A diminuição da sensibilidade ao espinosade na população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal, à semelhança do ocorrido no Paquistão, poderá ter decorrido de uma pressão seletiva por contato prévio com doses sub-letais de espinosade. Na verdade, o espinosade surgiu inicialmente no mercado como fitofármaco para controlo de pragas agrícolas (Thompson et al. 2000) direcionado, entre outras, para o tratamento de citrinos (União Europeia 2008) afetados por pragas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) (EGTOP 2011), espécie com elevada importância no contexto agrícola da Madeira devido aos elevados prejuízos que causa (Ciência Hoje 2011). Embora não estejam disponíveis dados sobre a utilização do espinosade na ilha da

Madeira, o distribuidor nacional de Spintor® 480 SC confirma a venda deste na RAM, fazendo com que a hipótese levantada para a presença de tolerância ou resistência seja uma possibilidade. Outra causa possível para a diminuição da sensibilidade, poderá ser a presença de mutações que conferem resistência ao espinosade nos indivíduos que colonizaram a ilha, à semelhança do que aconteceu com a resistência aos piretróides e DDT (Seixas 2012). Neste caso, o mecanismo de resistência envolvido poderá ser do tipo alteração do local-alvo, nomeadamente nos nAChR. Embora desconhecendo-se até ao momento quais os mecanismos de resistência presentes nos mosquitos, em *Plutella xylostella* (Baxter et al. 2010) e *Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895) (Thysanoptera: Thripidae) (Puinean et al. 2013), mutações no gene que codifica para a subunidade $\alpha 6$ do recetor nACh são responsáveis pela resistência a este biocida.

Os estudos de oviposição apontam para que as fêmeas não discriminem a presença do espinosade nos criadouros. Resultados semelhantes foram obtidos por Pérez e colaboradores (2007), embora estes tenham observado uma atração significativa por parte das fêmeas em realizarem posturas em contentores tratados com 20ppm (20mg/L) de espinosade. Este efeito pode ser explicado devido ao aroma característico deste biocida, a terra húmida, que pode ser atrativo para as fêmeas.

Apesar de os resultados apontarem para que a EstFx seja tolerante ou resistente ao espinosade este não deverá ser eliminado como uma possível ferramenta em futuras campanhas de controlo devido, em parte, aos resultados positivos que tem tido em múltiplos ensaios de laboratório e campo. Para isso deverão ser realizados novos ensaios de dose-resposta OMS para confirmar estes achados.

5.3. Utilização de *Bti* (Vectobac® G) como larvicida para *Aedes aegypti* na ilha da Madeira

Quanto ao *Bti*, os nossos resultados sugerem que a população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal é suscetível ao *Bti* na formulação comercial Vectobac® G. O mesmo cenário é observado em vários locais do globo, onde populações de *Aedes aegypti*, resistentes a inseticidas químicos, são suscetíveis ao *Bti* independentemente da sua formulação. Na ilha da Madeira não se conhece o perfil de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a larvicidas químicos, como *temephos*, mas partindo da provável origem

geográfica, Brasil e/ou Venezuela (Seixas, Salgueiro, et al. 2013), podemos suspeitar que esta população será resistente a este organofosforado à semelhança do previamente observado com o DDT. No Brasil, populações de *Aedes aegypti* com elevada resistência a este larvicida químico, apresentam-se suscetíveis ao *Bti* com $RR_{90} < 2$ (Araújo et al. 2013). Do mesmo modo, na ilha Martinica, testes de sensibilidade ao *Bti* efetuados com várias populações, demonstraram que estas, embora resistentes a *temephos* e ao adulticida deltametrina são, na sua maioria, suscetíveis a este biocida ($0,73 < RR_{95} < 2,34$) (Marcombe et al. 2012). Embora ainda não tenham sido registadas resistências ao *Bti* em populações de *Aedes aegypti*, essa possibilidade não deverá ser descartada (Paris et al. 2011), uma vez que já foi descrita numa população de *Culex pipiens* no estado de Nova Iorque, EUA (Paul et al. 2005).

Além da suscetibilidade ao *Bti*, foi observado, neste estudo, que as fêmeas não discriminam a presença deste biocida em criadouros tratados na dose testada, à semelhança do observado por Rodríguez et al. (2007).

Neste trabalho a formulação de *Bti* utilizada, é a recomendada pelo fabricante para o tratamento de grandes coleções de água com vegetação presente, tais como arrozais, podendo a sua dispersão ser por via terrestre ou aérea (Valent BioSciences Corp. 2003). Contudo, tem sido testada em ensaios de campo em coleções de água mais reduzidas ou em criadouros artificiais. Na Índia, o Vectobac® G foi testado para controlo de larvas de *Culex quinquefasciatus* em águas poluídas de caleiras de escoamento de fundo redondo (*U-drains*), fossas sépticas e tanques de cimento (Dominic Amalraj et al. 2000).

Durante a execução dos ensaios de dose-resposta, o método escolhido para avaliar a sensibilidade desta população culicídea ao *Bti* não terá sido o mais adequado. A dose de *Bti* por dissolução dos grãos de Vectobac® G pode não ser totalmente reprodutível. A opção de testar esta formulação em vez da suspensão comercial de *Bti*, Vectobac® 12AS ou o produto de grau analítico (*i.e.* IPS82, *Institut Pasteur*), deve-se, de acordo com as instruções do fabricante, à maior durabilidade do período de ação deste composto (Valent BioSciences Corp. 2003). Tendo sido impossível esmagar os grânulos de modo a transformá-los em pó, o único modo de obter uma solução de *Bti*, foi a selecionada. No entanto, este método não permitiu determinar as doses de

princípio ativo (*Bti*) a que a população de *Aedes aegypti* é sensível, impedindo o cálculo da concentração diagnóstico, essencial para um programa de controlo vetorial.

Na cidade do Funchal, o *Bti* foi utilizado para controlo das formas larvares (ECDC 2014b) presentes em sarjetas (resultados não publicados), por aplicação de sacos de rede, com malha fina presos às grelhas de proteção. Este método, embora nunca avaliada a sua eficácia, poderá ser uma forma de controlo eficaz em situações de surto, ou para controlo durante os meses de verão e outono.

5.4. Utilização de piriproxifeno como larvicida para *Aedes aegypti* na ilha da Madeira

Os reguladores do crescimento de insetos têm merecido cada vez mais atenção por parte dos investigadores, devido, em parte, aos resultados obtidos em vários estudos que apontam o piriproxifeno (PPF) como uma ferramenta de eleição para o controlo de vetores de dengue, particularmente *Aedes aegypti* (WHOPES 2006).

Itoh e colaboradores (1994) estimaram em laboratório, para duas populações naturais de *Aedes aegypti*, uma CIE₅₀ entre os $1,1 \times 10^{-5}$ mg/L e $5,6 \times 10^{-5}$ mg/L PPF. Já Darriet e Corbel (2006), em ensaios padronizados OMS com a estirpe de referência Bora-Bora (*Aedes aegypti*), reportaram uma CIE₅₀ de $1,1 \times 10^{-4}$ mg/L. Estes resultados, embora em doses mais elevadas, corroboram os obtidos neste trabalho, na qual foi estimada uma CIE₅₀ de $7,0 \times 10^{-5}$ mg/L PPF na EstFx. As diferenças de eficácia acima mencionadas são, presumivelmente, resultado de diferenças entre linhagens, formulações e condições experimentais. No entanto, é geralmente admitido que o piriproxifeno é eficaz a inibir a emergência de adultos em concentrações inferiores a 0,001 mg/L PPF (Sihuinha et al. 2005).

Devido à não linearidade observada na análise *Probit* (Anexo 1) da estirpe sensível Rockfeller, não foi possível caracterizar a população da cidade do Funchal quanto ao seu nível de suscetibilidade ou resistência ao PPF. Sabendo que a estirpe Rockfeller é fenotipicamente homogénea e considerada como estirpe de referência, estes resultados poderão dever-se a variáveis como, por exemplo, a evaporação nas tinas de teste.

Ainda que não tenham sido relatados casos de resistência, foi observada uma diminuição da suscetibilidade na estirpe *Vauclin* da ilha Martinica que, tal como *Aedes*

aegypti da cidade do Funchal, é resistente a piretróides (Darriet et al. 2010). De igual modo, Leyva e colaboradores (2010), reportaram uma diminuição da sensibilidade (RR=3,4) numa população 51 vezes mais resistente a *temephos* que a estirpe suscetível. Assim, deverá ser realizada uma caracterização mais cuidada da EstFx quanto à sua suscetibilidade ao PPF, tentando identificar resistências cruzadas com piretróides.

Devido ao seu modo de ação particular, foi observada, à semelhança de Resende e Gama (2006), uma maior mortalidade na fase de pupa que no estado larvar, nomeadamente na dose de 0,005mg/L PPF, corroborando que o PPF apresenta efeitos principalmente pupicidas. Esta situação poderá levar, caso seja aplicado na cidade do Funchal, a dificuldades de aceitação e compreensão por parte da comunidade local quanto à utilidade do PPF como inseticida direcionado ao controlo de *Aedes aegypti*. Tal deve-se à manutenção das formas larvares nos criadouros, que por ação deste composto, atingem tamanhos acima da média, tornando a sua presença mais evidente (Darriet & Corbel 2006). De forma a evitar tais constrangimentos, devem ser realizadas campanhas de esclarecimento de modo a clarificar as comunidades locais sobre funcionamento e utilidade do PPF no controlo de *Aedes aegypti*.

Embora neste trabalho não tenham sido realizados ensaios de efeito residual, estudos recentes têm apontado para que este seja elevado neste composto. Chen e colaboradores (2008) observaram que o PPF produz 80% de inibição de emergência em vasos de barro tratados com 10% e 20% (p/p) de PPF durante 22 e 25 semanas, respetivamente. Sihuincha e colaboradores (2005) registaram, com doses de 50 – 83ppb de PPF, em tanques de água de uso diário, a inibição de emergência por cinco meses.

Entre as particularidades do PPF, está a capacidade de este ser transportando entre biótopos larvares por mosquitos adultos contaminados com este RCI após contato prévio com criadouros tratados. Este fenómeno foi observado pela primeira vez por Itoh e colaboradores (1994). Estes autores provaram que fêmeas grávidas contaminadas por PPF, após contacto com uma superfície impregnada, conseguem transferir o composto para outros locais, provocando inibições de emergência entre a população larvar destes criadouros. Neste sentido, os resultados deste estudo, que apontam para o facto de as fêmeas não discriminarem entre copos de postura controlo e os copos tratados com PPF ($P>0,05$) (Anexo 2), reveste-se de particular importância.

A OMS sugere, para o tratamento de criadouros artificiais, uma dose de 0,01mg/L PPF (WHOPES 2013), cerca de 11 vezes superior à CIE₉₉ obtida neste trabalho para a população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal. Este facto e a não discriminação por parte das fêmeas de criadouros tratados com PPF, na dose máxima proposta pela OMS, tornam os nossos resultados, embora preliminares, animadores e encorajadores quanto a uma futura utilização de piriproxifeno na ilha da Madeira.

5.5. Considerações finais

Embora durante o verão de 2013 não tenham sido registados casos autóctones de dengue na ilha da Madeira, esta continua vulnerável a um outro surto por nova introdução do vírus. Para além do mais, não deve ser excluída a possibilidade de ocorrerem casos por outros serotipos que se encontram em circulação na América Latina e em África, nomeadamente Brasil (Villabona-Arenas et al. 2014), Venezuela (Urdaneta et al. 2005) e Angola (Parreira et al. 2014), áreas com que a Região Autónoma da Madeira mantém relações comerciais, turísticas e de migração. Além da dengue, outras patologias transmitidas por *Aedes aegypti*, como a febre de chikungunya e febre-amarela (FA) podem vir a ser introduzidas na ilha por turistas ou migrantes que habitem em regiões endémicas ou epidémicas para estas arboviroses. No caso de chikungunya e face ao surto que tem estado a decorrer nas ilhas das Caraíbas (Dezembro de 2013) e América Central (primeiro semestre 2014), a ilha da Madeira foi recentemente considerada como uma região de alto risco para a introdução desta virose (ECDC 2014a). Relativamente à febre-amarela, na presença de vacina, e numa região com um sistema de saúde muito bem organizado e acessível, a probabilidade de surto de FA de largas proporções é reduzida. Porém, e de forma a manter o risco em níveis reduzidos, a densidade da população adulta de *Aedes aegypti* deve ser mantida o mais baixo possível. Deste modo, os nossos resultados podem constituir um ponto de partida para a implementação de outras estratégias de controlo vetorial.

Dos produtos testados, o sal, o *Bti* e o piriproxifeno, foram aqueles que, devido ao seu sucesso e não prejuízos para o ambiente, se encontram em melhor posição para futuras aplicações em campanhas de controlo larvar na ilha da Madeira. Desta forma é nossa sugestão, que sejam realizados ensaios de campo, a fim determinar a exequibilidade, operacionalidade, custo-benefício e o impacte de tais medidas na

população culicídea das áreas afetadas, fornecendo às autoridades locais informação para que estas possam atuar de uma forma racional e baseada na evidência. O espinosade, embora com resultados menos animadores, não deve ser excluído de futuros ensaios de campo, principalmente devido aos resultados positivos que tem obtido como ferramenta de controlo das formas larvares de outras populações de *Aedes aegypti*.

Os produtos testados *Bti* e piriproxifeno e espinosade são considerados pela OMS como compostos de classe “U” e classe “III”, respetivamente. Embora o espinosade seja ligeiramente tóxico para peixes, moderadamente tóxico para zooplâncton e altamente tóxico para abelhas, e o PPF seja considerado moderadamente e altamente tóxico para peixes e zooplâncton, respetivamente (IPCS & IOMC 2010), a aplicação destes dois compostos em potenciais criadouros artificiais, de pequenas dimensões, localizados no espaço doméstico ou peri-doméstico é facilmente controlável, não devendo causar grande impacto no meio ambiente

Independentemente das opções futuramente tomadas, a monitorização de resistências a inseticidas deve ser mantida, com o objetivo de detetar alterações na sensibilidade, para que medidas efetivas e adaptadas sejam tomadas em função da alteração da resposta aos inseticidas em uso (WHO 1981).

6. Referências Bibliográficas

- Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal, 2011. *Atlas climático dos arquipélagos das Canárias, da Madeira e dos Açores* 1st ed. Instituto de Meteorologia de Portugal & A. y M. A. Agencia Estatal de Meteorología Ministerio de Agricultura, eds., Lisboa: Instituto de Meteorologia de Portugal.
- Ahmed, I. et al., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), pp.1117–1125.
- Almeida, A.P.G., 2011. Os Mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua Importancia Médica em Portugal. Desafios para o Século XXI. *Acta Med Port*, 24(6), pp.961–974.
- Almeida, A.P.G. et al., 2007. Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Euro Surveillance*, 12(46), p.3311.
- Alphey, L. et al., 2010. Sterile-Insect Methods for Control of Mosquito-Borne Diseases: An Analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), pp.295–311.
- Alves, M.J. et al., 2013. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(6), pp.3–6.
- Araújo, A. et al., 2013. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasites & Vectors*, 6(1), p.297.
- Araújo, R.N. et al., 2012. Interação entre os Insetos Hematófagos e seus Hospedeiros Vertebrados. In *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, pp. 1–19.
- Barnett, E.D., 2007. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Disease*, 44(6), pp.850–856.
- Baxter, S.W. et al., 2010. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor alpha6 are associated with field evolved spinosad resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS genetics*, 6(1), p.e1000802.
- Bechtel, D.B. & Bulla Jr., L.A., 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), pp.1472–1481.
- Becker, N. et al., 2003. *Mosquitoes and their control* 1st ed., New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Bhatt, S. et al., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), pp.504–507.

- Bond, J.G., Marina, C.F. & Williams, T., 2004. The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Medical and veterinary entomology*, 18(1), pp.50–6.
- Braga, I.A. & Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), pp.279–293.
- Bravo, A. et al., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), pp.423–31.
- Bravo, A., Gill, S.S. & Soerón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), pp.423–435.
- Bull, D.L. & Whitten, C.J., 1972. Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), pp.561–564.
- Câmara Municipal do Funchal, 2014. Concelho do Funchal. *Cidade*. Available at: http://www.cm-funchal.pt/index.php?option=com_cidade&Itemid=7 [Acedido em 17 de janeiro de 2014].
- Canas Ferreira, W.F. & Sousa, J.C. de F., 1998. *Microbiologia - Vol 1* 1st ed. LIDEL Edições Técnicas, ed., Lisboa, Portugal: LIDEL Edições Técnicas.
- Capela, R.A., 1981. Contribution to the study of Mosquitoes (Diptera, Culicidae) from the Archipelagos of Madeira and Selvagens I - Madeira. *Arquivos do Museu Bocage (Série A)*, 1(1915), pp.45–66.
- Capinera, J., 2008. *Encyclopedia of Entomology* 2nd ed., Springer.
- Carroll, J. & Ellar, D.J., 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *European journal of biochemistry*, 214(3), pp.771–778.
- Che-mendoza, A., Penilla, R.P. & Rodríguez, D.A., 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes : A review. *African Journal of Biotechnology*, 8(8), pp.1386–1397.
- Chen, C.D. et al., 2008. Effectiveness of pyriproxyfen-controlled release block against larvae of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Kuala Lumpur, Malaysia. *Dengue Bulletin*, 32, pp.199–206.
- Chistophers, S.R., 1960. *Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure*, London, UK: Cambridge University Press.
- Ciência Hoje, 2011. Projecto de combate à Mosca-do-Mediterrâneo. *Jornal de Ciência, Tecnologia e Empreendedorismo*, p.1. Available at: <http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=48617&op=all> [Acedido em 3 de junho de 2014].
- Crickmore, N. et al., 2013. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available at: <http://www.btnomenclature.info/> [Acedido em 9 de fevereiro de 2014].

- Crickmore, N. et al., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), pp.807–13.
- D’Amato, C., Torres, J. & Malm, O., 2002. DDT (Diclorodifeniltricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental - Uma Revisão. *Química Nova*, 25(6), pp.995–1002.
- Darriet, F. et al., 2010. Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). *Parasites & vectors*, 3, p.88.
- Darriet, F. & Corbel, V., 2006. Laboratory evaluation of pyriproxyfen and spinosad, alone and in combination, against *Aedes aegypti* larvae. *Journal of medical entomology*, 43(6), pp.1190–1194.
- Darriet, F., Duchon, S. & Hougard, J., 2005. Spinosad: A new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4), pp.495–496.
- DGS, 2012. *Comunicado do Diretor-geral da Saúde C46.01.v1: Casos de Dengue na Região Autónoma da Madeira*, Lisboa.
- DGS, 2013a. Dengue na Ilha da Madeira - situação em 01 de setembro de 2013. *Informação mensal sobre dengue na Ilha da Madeira*, p.1. Available at: http://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/dengue-madeira-situacao-em-2013_09_01-pdf.aspx [Acedido em 3 de fevereiro de 2014].
- DGS, 2013b. Surto de dengue na Ilha da Madeira - situação em 3 de março de 2013. *Informação mensal sobre dengue na Ilha da Madeira*. Available at: http://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/dengue-madeira-situacao-em-2013_03_03-pdf.aspx [Acedido em 3 de fevereiro de 2014].
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. & Le, D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43(134), pp.545–69.
- Dominic Amalraj, D. et al., 2000. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta tropica*, 75(2), pp.243–6.
- Dong, K., 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1), pp.17–30.
- ECDC, 2014a. Chikungunya outbreak in Caribbean region. *Rapid Risk Assessment*, pp.1–7. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/chikungunya-caribbean-june-2014-risk-assessment.pdf> [Acedido em 14 de julho de 2014].
- ECDC, 2014b. *Dengue outbreak in Madeira, Portugal. March 2013*, Stockholm.
- ECDC, 2013. *Dengue outbreak in Madeira, Portugal. October–November 2012*, Stockholm.
- ECDC, 2012. *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*, Stockholm.

- Edwards, H.A., 1982. Free amino acids as regulators of osmotic pressure in aquatic insect larvae. *Journal of Experimental Biology*, 101, pp.153–160.
- Eger, J.E. & Lindenberg, L.B., 1998. Utility of Spinosad for insect control in Florida vegetables. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, (111), pp.55–57.
- EGTOP, 2011. *Final Report on Plant Protection Products*, Bruxelles, Belgica.
- Failloux, A.-B., Vazeille, M. & Rodhain, F., 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55(6), pp.653–663.
- Ferreira, L.M. & Silva-Filha, M.H.N.L., 2013. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 23(10), pp.1137–1168.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis* 3rd ed., Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Georghiou, G.P., 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection*, 75(4), pp.51–59.
- Gonçalves, Y., Silva, J. & Biscoito, M., 2008. On the presence of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Insecta, Diptera, Culicidae) in the Island of Madeira (Portugal). *Bol. Mus. Mun. Funchal*, 58(322), pp.53–59.
- Grisales, N. et al., 2013. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(9), p.e2438.
- Gubler, D.J., 1998a. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), pp.480–496.
- Gubler, D.J., 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical medicine and health*, 39(4 Suppl), pp.3–11.
- Gubler, D.J., 1998b. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging infectious diseases*, 4(3), pp.442–450.
- Halstead, S.B., 2008. *Dengue Tropical Medicine: Science and Practice* 5th ed. G. Pasvol & S. L. Hoffman, eds., London, UK: Imperial College Press.
- Hedenqvist, P. & Hellebrekers, L.J., 2003. Laboratory animal analgesia, anesthesia, and euthanasia. In J. Hau & G. L. J. Van Hoosier, eds. *Handbook of laboratory animal science*. Boca Raton, USA: CRC Press LLC, pp. 413–456.
- Hemingway, J. et al., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), pp.653–65.
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, pp.1009–1015.

- Hemingway, J. & Karunaratne, S.H., 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and veterinary entomology*, 12(1), pp.1–12.
- Hemingway, J. & Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of Human disease. *Annual Review of Entomology*, 45, pp.371–391.
- Holstein, M., 1967. Dynamics of *Aedes aegypti* distribution, density and seasonal prevalence in the Mediterranean area. *Bulletin of the World Health Organization*, 36(4), pp.541–3.
- Huang, F.-F. et al., 2008. The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 9(1), p.563.
- Ibarra, J.E. & Federici, B.A., 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 165(2), pp.527–533.
- Ibrahim, M.A. et al., 2010. *Bacillus thuringiensis* a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), pp.31–50.
- INE, 2012. *Censos 2011 Resultados Definitivos - Região Autónoma da Madeira* Instituto Nacional de Estatística, ed., Lisboa.
- Invest, J.F. & Lucas, J.R., 2008. Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In W. Robinson & D. Bajomi, eds. *Sixth International Conference on Urban Pests*. Veszprém: OOK-Press, pp. 239–246.
- IPCS, 1999. *Microbial Pest Control Agent - Bacillus thuringiensis (Environmental Health Criteria 217)*, Geneve, Switzerland: World Health Organization.
- IPCS & IOMC, 2010. *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*, Geneve, Switzerland.
- Itoh, T. et al., 1994. Utilization of bloodfed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval habitats. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(3), pp.344–347.
- Jansen, C.C. & Beebe, N.W., 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and infection*, 12(4), pp.272–9.
- Jude, P.J. et al., 2012. Salinity-tolerant larvae of mosquito vectors in the tropical coast of Jaffna, Sri Lanka and the effect of salinity on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* to *Aedes aegypti* larvae. *Parasites & vectors*, 5(1), p.269.
- Kamgang, B. et al., 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors*, 4, p.79.
- Karaagac, S.U., 2011. Insecticide Resistance. In F. Perveen, ed. *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management*. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 469–478.

- Karunaratne, S.H.P.P., 1998. Insecticide Resistance in Insects: a Review. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.)*, 25, pp.72–99.
- Kay, B. & Vu, S.N., 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet*, 365(9459), pp.613–617.
- Kemabonta, A. & Nwankwo, A., 2013. Larvicidal effectiveness of spinosad and temephos on *Anopheles gambiae* & *Aedes aegypti*. *International Journal of Science and Nature*, 4(2), pp.214–222.
- Khan, H.A.A. et al., 2011. First report of field evolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasites & vectors*, 4(1), p.146.
- Kirst, H. a, 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *The Journal of antibiotics*, 63(3), pp.101–11.
- Kucharz, E.J. & Cebula-Byrska, I., 2012. Chikungunya fever. *European journal of internal medicine*, 23(4), pp.325–329.
- Kuno, G., 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), pp.957–971.
- Lamballerie, X. et al., 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology Journal*, 5(1), p.33.
- Laurence, D., Christophe, L. & Roger, F., 2011. Using the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in Mosquito Control. In M. Stoytcheva, ed. *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 95–126.
- Leyva, Y.R. et al., 2010. Eficacia del pyriproxifeno para el control de *Aedes (S.) aegypti* (Diptera: Culicidae) en cepas con diferentes niveles de resistencia a temefos. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 62(3), pp.224–229.
- Marcombe, S. et al., 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*, 10, p.494.
- Marcombe, S. et al., 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PloS one*, 7(2), p.e30989.
- Margarita, Y. et al., 2006. Mosquitos de Portugal: primeiro registo de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera, Culicidae) na Ilha da Madeira. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 13(1/2), pp.59–61.
- Marina, C.F. et al., 2011. Spinosad as an effective larvicide for control of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, vectors of dengue in southern Mexico. *Pest management science*, 67(1), pp.114–21.

- Maroco, J., 2007. *Análise Estatística - Com utilização do SPSS* 3rd ed. M. Robalo, ed., Lisboa, Portugal: Edições Sílabo.
- Marquardt, W. et al., 2005. *Biology of Diseases Vectors* 2nd ed., London, UK: Elsevier Academic Press.
- McGraw, E.A. & O'Neill, S.L., 2013. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature reviews. Microbiology*, 11(3), pp.181–193.
- Melim, M., 2009. *Aedes aegypti* em Portugal: a presença de *Aedes aegypti* na Região Autónoma da Madeira. Comunicação Oral, Reunião do Projecto Revive.
- Mertz, F.P. & Yao, R.C., 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from soil collected in a sugar mill Rum still. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(1), pp.34–39.
- Millar, N.S. & Denholm, I., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate neuroscience : IN*, 7(1), pp.53–66.
- Monath, T.P., 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infectious Diseases*, 1(August), pp.11–20.
- Moore, M. et al., 2013. Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(4), p.e2175.
- Moreira, M.F., Mansur, J.F. & Figueira-Mansur, J., 2013. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In C. Termignoni, H. Masuda, & M. A. C. da Silva Neto, eds. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. pp. 2–14.
- Morrison, A.C. et al., 2008. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS medicine*, 5(3), p.e68.
- Mukhopadhyay, A. et al., 2010. Effect of common salt on laboratory reared immature stages of *Aedes aegypti* (L). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(3), pp.173–175.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. & Pfauer, M.A., 2006. *Microbiología Médica* 5th ed. Elsevier, ed., Madrid, Espanha: Elsevier Academic Press.
- Nature Education, 2011. *Aedes aegypti* life cycle. *Dengue Fever*. Available at: <http://www.nature.com/scitable/content/aedes-aegypti-life-cycle-22400575> [Acedido em 23 de março de 2014].
- Normile, D., 2013. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science*, 342(6157), p.415.
- Oliveira, C.D. & Moreira, L.A., 2012. Uso de *Wolbachia* no Controle Biológico. In *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, pp. 2–10.
- Orr, N. et al., 2009. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95(1), pp.1–5.

- Paris, M. et al., 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest management science*, 67(1), pp.122–8.
- Parreira, R. et al., 2014. Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola. *Euro Surveillance*, 19(10), p.20730.
- Pates, H. & Curtis, C., 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, 50, pp.53–70.
- Paul, A. et al., 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(3), pp.305–309.
- Pereira Neves, D., 2004. *Parasitologia Humana* 11th ed. A. L. Melo, P. M. Linardi, & R. W. A. Vitor, eds., São Paulo, Brasil: Atheneu.
- Péres, C. et al., 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), pp.18303–18308.
- Pérez, C.M. et al., 2007. Spinosad, a naturally derived insecticide, for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): efficacy, persistence, and elicited oviposition response. *Journal of medical entomology*, 44(4), pp.631–8.
- Perry, T., Batterham, P. & Daborn, P.J., 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), pp.411–22.
- Pialoux, G. et al., 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *The Lancet infectious diseases*, 7(5), pp.319–27.
- Poupardin, R. et al., 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic toxicology*, 114-115, pp.49–57.
- Puinean, A.M. et al., 2013. A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Neurochemistry*, 124(5), pp.590–601.
- Quintas, A., Freire, A.P. & Halpern, M.J., 2008. *Bioquímica - Organização Molecular da Vida* 1st ed., Lisboa, Portugal: LIDEL Edições Técnicas.
- Rafatjah, H.A., 1988. Malaria vector control: environmental management. Volume 2. In W. H. Wernsdorfer & I. McGregor, eds. *Malaria: Principles and Practices of Malariology*. New York, USA: Churchill Livingstone, pp. 1135–1171.
- Ramasamy, R. et al., 2011. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(11), p.e1369.
- Renault, P. et al., 2007. A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island ., 77(4), pp.727–731.

- Resende, M.C. & Gama, R.A., 2006. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(1), pp.72–75.
- Ribeiro, H. et al., 1988. An annotated checklist of the mosquitoes of continental Portugal (Diptera, Culicidae). In *Actas do III Congresso Iberico de Entomologia*. Granada, pp. 233–254.
- Riddiford, L.M., 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *General and Comparative Endocrinology*, 179(3), pp.477–484.
- Robinson, M.C., 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 49(1), pp.28–32.
- Rodríguez, J.R. et al., 2007. Conducta de oviposición de *Aedes aegypti* (L.) en presencia de *Macrocyclops albidus* (J.) y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en condiciones de laboratorio. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 59(1), pp.73–75.
- Rodríguez-Péres, M.A., Howard, A.F. V. & Reyes-Villanueva, F., 2012. Biological control of dengue virus vectors. In S. Soloneski, ed. *Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics*. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 241–270.
- Rogers, D.J. et al., 2006. The Global Distribution of Yellow Fever and Dengue. *Adv. Parasitol.*, 62(05), pp.181–220.
- Salgado, V.L., 1998. Studies on the Mode of Action of Spinosad: insect symptoms and physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60(2), pp.91–102.
- Salgado, V.L. & Saar, R., 2004. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Journal of insect physiology*, 50(10), pp.867–79.
- Salgado, V.L. & Sparks, T.C., 2010. The Spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. In L. I. Gelbert & S. S. Gill, eds. *Insect Control - Biological and Synthetic Agents*. London, UK: Academic Press, pp. 207–239.
- Sambri, V. et al., 2008. The 2007 epidemic outbreak of Chikungunya virus infection in the Romagna region of Italy: a new perspective for the possible diffusion of tropical diseases in temperate areas? *The new microbiologica*, 31(3), pp.303–4.
- Santos, E. et al., 2010. Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. *Neotropical entomology*, 39(2), pp.299–302.
- Schnepf, E. et al., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 62(3), pp.775–806.
- Scholte, E.-J. et al., 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4(19), pp.1–24.

- Schünemann, R., Knaak, N. & Fiuza, L.M., 2014. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN microbiology*, 2014, p.135675.
- Seixas, G., 2012. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas. Tese de Mestrado, IHMT, Universidade Nova de Lisboa.
- Seixas, G., Novo, M.T., et al., 2013. *Aedes aegypti* and the outcomes of a mosquito invasion. DGaE 18-21 March. Gottingen.
- Seixas, G., Salgueiro, P., et al., 2013. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 Suppl(1998), pp.3–10.
- Sihuíncha, M. et al., 2005. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), pp.620–630.
- Simmons, C.P. et al., 2012. Dengue: Current Concepts. *New England Journal of Medicine*, 366(15), pp.1423–1432.
- Sousa, C.A. et al., 2012. Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. *Euro Surveill*, 17(49), pp.8–11.
- Sparks, T.C., Crouse, G.D. & Durst, G., 2001. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest management science*, 57(10), pp.896–905.
- Staal, G.B., 1975. Insect Growth Regulators with Juvenile Hormone Activity. *Annual Review of Entomology*, (20), pp.417–460.
- Su, T. & Cheng, M.-L., 2014a. Cross Resistances in Spinosad-Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).
- Su, T. & Cheng, M.-L., 2014b. Laboratory selection of resistance to spinosad in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 51(2), pp.421–427.
- Su, T. & Cheng, M.-L., 2012. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* to spinosad: a preliminary report. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(3), pp.263–267.
- Thavara, U. et al., 2009. Field evaluation in Thailand of spinosad, a larvicide derived from *Saccharopolyspora spinosa* (Actinomycetales) against *Aedes aegypti* (L.) larvae. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 40(2), pp.235–42.
- Thiberville, S.-D. et al., 2013. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, 99(3), pp.345–70.
- Thompson, G.D., Dutton, R. & Sparks, T.C., 2000. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science*, 56, pp.696–702.

- Tilak, R. et al., 2005. A laboratory investigation into oviposition responses of *Aedes aegypti* to some common household substances and water from conspecific larvae. *Medical Journal Armed Forces India*, 61, pp.227–229.
- União Europeia, 1998. *Diretiva 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Fevereiro de 1998 relativa à colocação de produtos biocidas no mercado*, Jornal Oficial das Comunidades Europeias.
- União Europeia, 2008. *Regulamento nº 149/2008 da comissão de 29 de Janeiro de 2008 que altera o Regulamento (CE) nº 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do me*, Bruxelas, Belgica: Jornal Oficial da União Europeia.
- Urdaneta, L. et al., 2005. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection, Genetics and Evolution*, 5, pp.177–184.
- Vachon, V., Laprade, R. & Schwartz, J.-L., 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of invertebrate pathology*, 111(1), pp.1–12.
- Valent BioSciences Corp., 2003. Vectobac: Technical Use Bulletin for VectoBac G e CG Mosquito Larvicide. *VectoBac Granules*, pp.1–3.
- Van, H.T., 2011. Application of mosquito—proof water containers in the reduction of dengue mosquito population in a dengue endemic province of Vietnam. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1(4), pp.270–274.
- Vasconcelos, P.F., 2003. Febre-amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2), pp.275–293.
- Villabona-Arenas, C.J. et al., 2014. Detection of Four Dengue Serotypes Suggests Rise in Hyperendemicity in Urban Centers of Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), p.e2620.
- Watson, G.B., 2001. Actions of Insecticidal Spinosyns on gamma-aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71, pp.20–28.
- Wermelinger, E.D. & Ferreira, A.P., 2013. Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 4(3), pp.49–54.
- WHO, 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control* 2nd ed., Geneve, Switzerland: World Health Organization.
- WHO, 2009. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition*, Geneve, Switzerland.
- WHO, 2004. *Global Strategic Framework for Integrated Vector Management*, Geneve, Switzerland.

- WHO, 2012. *Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020*, Geneve, Switzerland: World Health Organization.
- WHO, 2005. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*, Geneve, Switzerland.
- WHO, 1981. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*, Geneve, Switzerland.
- WHO, 1970. *Resistencia a los Inseticidas y Lucha Contra los Vetores*, Geneve, Switzerland.
- WHO, 2000. *Scientific Working Group on Dengue 3-5 April 2000*, Geneve, Switzerland.
- WHO, 1998. *Techniques to Detect Insecticide Resistance Mechanism*, Geneve, Switzerland.
- WHO, 2007. *WHO Specification and Evaluations for Public Health Pesticides: Spinosad*, Geneve, Switzerland.
- WHO & RBM, 2012. *Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM)*, Geneve, Switzerland.
- WHOPES, 2006. *Pesticides and Their Application - For the control of vectors and pest of public health importance* 6th ed. C. F. Curtis, ed., Geneve, Switzerland.
- WHOPES, 2013. Recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. *Safety and effectiveness*, (October). Available at: <http://www.who.int/whopes/recommendations/en/> [Acedido em 27 de março de 2014].
- WHOPES, 2001. *Report of the Fourth WHOPES Working Group Meeting*, Geneve, Switzerland.
- Wirth, M.C. et al., 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), pp.185–189.
- Zaim, M., Aitio, A. & Nakashima, N., 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(1), pp.1–5.
- Zaim, M. & Guillet, P., 2002. Alternative insecticides : an urgent need. *Trends in Parasitology*, 18(4), pp.161–163.
- Zhao, J. et al., 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology*, 95(2), pp.430–436.

ANEXOS

Anexo 1: Probit dos ensaios de DR OMS por biolarvicida e estirpe de mosquito

Resultados da análise do Teste de grau de adequação de Pearson (“Pearson goodness-of-fit chi-square”).

- **SAL EstRock**

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	10,008	5	,075 ^a

a. Como o nível de significado é menor que ,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **SAL EstFx**

Testes de chi-quadrado

	Chi-quadrado	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	7,743	3	,052 ^a

a. Como o nível de significado é menor que ,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **ESPINOSADE EstRock**

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	6,158	3	,104 ^a

a. Como o nível de significado é menor que,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **ESPINOSADE EstFx**

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	22,903	3	,000 ^a

a. Como o nível de significado é menor que,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **Bti EstRock**

Testes de chi-quadrado

	Chi-quadrado	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	7,527	3	,057 ^a

a. Como o nível de significado é menor que ,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **Bti EstFx**

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	7,157	3	,067 ^a

a. Como o nível de significado é menor que ,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **PPF EstRock**

Testes de chi-quadrado

	Chi-quadrado	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	17,672	3	,001 ^a

a. Como o nível de significado é menor que ,150, um fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

- **PPF EstFx**

Testes de chi-quadrado

	Chi-quadrado	df ^b	Sig.
PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	3,641	3	,303 ^a

a. Como o nível de significado é maior que ,150, nenhum fator de heterogeneidade é usado no cálculo de limites de confiança.

b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.

As tabelas seguintes apresentam os valores estimados com base no modelo “probit”, para as concentrações letais e concentrações de inibição de emergência, referentes a cada um dos biolarvicidas testados pelos ensaios DR da OMS, capazes de produzir percentagens de mortalidade entre 1% e 99%.

- **SAL EstRock**

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for Concentração de Sal (g/L)			95% Confidence Limits for log(Concentração de Sal (g/L)) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a ,010	9,342	8,686	9,774	,970	,939	,990
,020	9,551	8,943	9,952	,980	,951	,998
,030	9,686	9,109	10,067	,986	,959	1,003
,040	9,789	9,235	10,155	,991	,965	1,007
,050	9,874	9,339	10,227	,994	,970	1,010
,060	9,946	9,429	10,289	,998	,974	1,012
,070	10,010	9,508	10,344	1,000	,978	1,015
,080	10,068	9,579	10,394	1,003	,981	1,017
,090	10,120	9,644	10,439	1,005	,984	1,019
,100	10,169	9,704	10,481	1,007	,987	1,020
,150	10,373	9,956	10,657	1,016	,998	1,028
,200	10,539	10,160	10,802	1,023	1,007	1,033
,250	10,682	10,336	10,929	1,029	1,014	1,039
,300	10,813	10,495	11,047	1,034	1,021	1,043
,350	10,936	10,642	11,159	1,039	1,027	1,048
,400	11,054	10,781	11,269	1,044	1,033	1,052
,450	11,169	10,915	11,379	1,048	1,038	1,056
CL50 ,500	11,283	11,045	11,492	1,052	1,043	1,060
,550	11,399	11,173	11,610	1,057	1,048	1,065
,600	11,518	11,300	11,736	1,061	1,053	1,070
,650	11,642	11,429	11,872	1,066	1,058	1,075
,700	11,774	11,560	12,022	1,071	1,063	1,080
,750	11,918	11,699	12,192	1,076	1,068	1,086
,800	12,081	11,849	12,390	1,082	1,074	1,093
,850	12,273	12,021	12,632	1,089	1,080	1,101
,900	12,520	12,233	12,949	1,098	1,088	1,112
,910	12,580	12,284	13,028	1,100	1,089	1,115
,920	12,646	12,339	13,115	1,102	1,091	1,118
,930	12,719	12,400	13,211	1,104	1,093	1,121
,940	12,801	12,468	13,320	1,107	1,096	1,125
,950	12,895	12,545	13,446	1,110	1,098	1,129
,960	13,006	12,636	13,595	1,114	1,102	1,133
,970	13,144	12,748	13,782	1,119	1,105	1,139
,980	13,330	12,898	14,036	1,125	1,111	1,147
CL99 ,990	13,628	13,136	14,446	1,134	1,118	1,160

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

- **SAL EstFx**

Limites de confiança								
Probabilidade	Limites de confiança de 95% para Concentração de Sal (g/L)			Limites de confiança de 95% para log(Concentração de Sal (g/L)) ^b				
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior		
PROBIT ^a	,010	8,700	7,853	9,264	,939	,895	,967	
	,020	8,971	8,178	9,498	,953	,913	,978	
	,030	9,147	8,390	9,650	,961	,924	,985	
	,040	9,282	8,554	9,766	,968	,932	,990	
	,050	9,393	8,689	9,862	,973	,939	,994	
	,060	9,488	8,805	9,944	,977	,945	,998	
	,070	9,573	8,908	10,017	,981	,950	1,001	
	,080	9,650	9,001	10,083	,985	,954	1,004	
	,090	9,720	9,087	10,144	,988	,958	1,006	
	,100	9,785	9,166	10,200	,991	,962	1,009	
	,150	10,058	9,500	10,438	1,003	,978	1,019	
	,200	10,281	9,772	10,633	1,012	,990	1,027	
	,250	10,476	10,010	10,806	1,020	1,000	1,034	
	,300	10,654	10,225	10,966	1,028	1,010	1,040	
	,350	10,822	10,427	11,120	1,034	1,018	1,046	
	,400	10,984	10,618	11,271	1,041	1,026	1,052	
	CL50	,450	11,143	10,802	11,423	1,047	1,034	1,058
		,500	11,302	10,983	11,580	1,053	1,041	1,064
		,550	11,463	11,161	11,745	1,059	1,048	1,070
		,600	11,629	11,338	11,921	1,066	1,055	1,076
,650		11,802	11,517	12,113	1,072	1,061	1,083	
,700		11,989	11,701	12,327	1,079	1,068	1,091	
,750		12,193	11,895	12,571	1,086	1,075	1,099	
,800		12,424	12,106	12,858	1,094	1,083	1,109	
,850		12,699	12,348	13,210	1,104	1,092	1,121	
,900		13,054	12,649	13,677	1,116	1,102	1,136	
,910		13,142	12,722	13,794	1,119	1,105	1,140	
,920		13,237	12,800	13,922	1,122	1,107	1,144	
,930		13,343	12,887	14,065	1,125	1,110	1,148	
,940		13,462	12,984	14,227	1,129	1,113	1,153	
,950		13,599	13,096	14,415	1,134	1,117	1,159	
,960		13,762	13,227	14,639	1,139	1,121	1,166	
,970		13,965	13,389	14,921	1,145	1,127	1,174	
CL99		,980	14,239	13,666	15,305	1,153	1,134	1,185
		,990	14,682	13,953	15,934	1,167	1,145	1,202

a. E usado um fator de heterogeneidade.

b. Base de logaritmo = 10.

- **ESPINOSADE EstRock**

Confidence Limits								
Probability	95% Confidence Limits for Concentração de Spintor (mg/L Al)			95% Confidence Limits for log(Concentração de Spintor (mg/L Al)) ^b				
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound		
PROBIT ^a	,010	,005	,002	,006	-2,330	-2,696	-2,198	
	,020	,005	,002	,007	-2,285	-2,610	-2,167	
	,030	,006	,003	,007	-2,257	-2,556	-2,147	
	,040	,006	,003	,007	-2,235	-2,515	-2,132	
	,050	,006	,003	,008	-2,218	-2,482	-2,120	
	,060	,006	,004	,008	-2,203	-2,454	-2,109	
	,070	,006	,004	,008	-2,190	-2,429	-2,100	
	,080	,007	,004	,008	-2,179	-2,407	-2,091	
	,090	,007	,004	,008	-2,168	-2,388	-2,084	
	,100	,007	,004	,008	-2,158	-2,369	-2,077	
	,150	,008	,005	,009	-2,118	-2,294	-2,047	
	,200	,008	,006	,009	-2,086	-2,235	-2,023	
	,250	,009	,007	,010	-2,058	-2,185	-2,001	
	,300	,009	,007	,010	-2,034	-2,141	-1,980	
	,350	,010	,008	,011	-2,011	-2,102	-1,960	
	,400	,010	,009	,012	-1,989	-2,066	-1,938	
	,450	,011	,009	,012	-1,968	-2,034	-1,916	
	CL50	,500	,011	,010	,013	-1,947	-2,006	-1,891
		,550	,012	,010	,014	-1,927	-1,960	-1,863
		,600	,012	,011	,015	-1,906	-1,956	-1,831
		,650	,013	,012	,016	-1,884	-1,934	-1,796
		,700	,014	,012	,017	-1,861	-1,913	-1,758
		,750	,015	,013	,019	-1,836	-1,892	-1,714
		,800	,016	,013	,022	-1,809	-1,870	-1,665
		,850	,017	,014	,025	-1,777	-1,846	-1,606
		,900	,018	,015	,029	-1,736	-1,816	-1,530
		,910	,019	,016	,031	-1,727	-1,809	-1,512
		,920	,019	,016	,032	-1,716	-1,801	-1,492
		,930	,020	,016	,034	-1,704	-1,793	-1,470
		,940	,020	,016	,036	-1,691	-1,784	-1,445
		,950	,021	,017	,038	-1,676	-1,773	-1,417
		,960	,022	,017	,041	-1,659	-1,761	-1,384
		,970	,023	,018	,045	-1,638	-1,746	-1,344
	CL99	,980	,025	,019	,051	-1,609	-1,726	-1,289
		,990	,027	,020	,063	-1,564	-1,695	-1,203

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

- **ESPINOSADE EstFx**

Confidence Limits								
Probability		95% Confidence Limits for Concentração de Spintor (mg/L Al)			95% Confidence Limits for log(Concentração de Spintor (mg/L Al)) ^b			
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT ^a	,010	,014	,005	,019	-1,857	-2,273	-1,711	
	,020	,016	,007	,021	-1,806	-2,174	-1,676	
	,030	,017	,008	,022	-1,775	-2,112	-1,654	
	,040	,018	,009	,023	-1,751	-2,065	-1,637	
	,050	,019	,009	,024	-1,731	-2,026	-1,623	
	,060	,019	,010	,024	-1,715	-1,994	-1,611	
	,070	,020	,011	,025	-1,700	-1,966	-1,601	
	,080	,021	,011	,026	-1,687	-1,941	-1,591	
	,090	,021	,012	,026	-1,675	-1,918	-1,582	
	,100	,022	,013	,027	-1,664	-1,897	-1,574	
	,150	,024	,015	,029	-1,619	-1,811	-1,540	
	,200	,026	,018	,031	-1,583	-1,744	-1,511	
	,250	,028	,021	,033	-1,553	-1,688	-1,485	
	,300	,030	,023	,035	-1,525	-1,640	-1,459	
	,350	,032	,025	,037	-1,500	-1,598	-1,433	
	,400	,033	,027	,039	-1,475	-1,561	-1,405	
	,450	,035	,030	,042	-1,452	-1,528	-1,375	
	CL50	,500	,037	,032	,045	-1,429	-1,499	-1,342
		,550	,039	,034	,048	-1,405	-1,472	-1,307
		,600	,041	,036	,054	-1,382	-1,448	-1,268
,650		,044	,038	,059	-1,358	-1,425	-1,227	
,700		,047	,040	,066	-1,332	-1,403	-1,181	
,750		,050	,042	,074	-1,305	-1,380	-1,130	
,800		,053	,044	,085	-1,274	-1,356	-1,072	
,850		,058	,047	,099	-1,238	-1,329	-1,003	
,900		,064	,051	,121	-1,193	-1,296	-,916	
,910		,066	,052	,127	-1,182	-1,288	-,895	
,920		,068	,053	,134	-1,170	-1,279	-,871	
,930		,070	,054	,143	-1,157	-1,270	-,846	
,940		,072	,055	,152	-1,143	-1,260	-,817	
,950		,075	,056	,164	-1,126	-1,248	-,785	
,960		,078	,058	,179	-1,107	-1,234	-,747	
,970		,083	,061	,200	-1,083	-1,218	-,699	
,980		,089	,064	,231	-1,051	-1,196	-,636	
CL99		,990	,100	,069	,290	-1,001	-1,161	-,537

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

- **Bti EstRock**

Limites de confiança

Probabilidade	Limites de confiança de 95% para ml/L			Limites de confiança de 95% para log(ml/L) ^b			
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	
PROBIT ^a	,010	,960	,368	1,472	-,018	-,434	,168
	,020	1,123	,477	1,653	,050	-,322	,218
	,030	1,240	,562	1,780	,094	-,251	,250
	,040	1,337	,635	1,883	,126	-,197	,275
	,050	1,421	,701	1,972	,153	-,154	,295
	,060	1,497	,763	2,051	,175	-,117	,312
	,070	1,566	,822	2,123	,195	-,085	,327
	,080	1,632	,878	2,190	,213	-,057	,340
	,090	1,693	,932	2,253	,229	-,031	,353
	,100	1,752	,984	2,314	,244	-,007	,364
	,150	2,018	1,233	2,585	,305	,091	,413
	,200	2,258	1,472	2,832	,354	,168	,452
	,250	2,486	1,707	3,071	,395	,232	,487
	,300	2,710	1,945	3,313	,433	,289	,520
	,350	2,937	2,187	3,567	,468	,340	,552
	,400	3,169	2,434	3,841	,501	,386	,584
	,450	3,411	2,687	4,146	,533	,429	,618
CL50	,500	3,667	2,947	4,494	,564	,469	,653
	,550	3,942	3,213	4,897	,596	,507	,690
	,600	4,243	3,489	5,376	,628	,543	,730
	,650	4,579	3,777	5,953	,661	,577	,775
	,700	4,961	4,084	6,663	,696	,611	,824
	,750	5,409	4,422	7,563	,733	,646	,879
	,800	5,956	4,810	8,749	,775	,682	,942
	,850	6,663	5,281	10,412	,824	,723	1,018
	,900	7,674	5,914	13,022	,885	,772	1,115
	,910	7,941	6,074	13,752	,900	,783	1,138
	,920	8,241	6,252	14,595	,916	,796	1,164
	,930	8,583	6,452	15,585	,934	,810	1,193
	,940	8,983	6,682	16,773	,953	,825	1,225
	,950	9,462	6,952	18,245	,976	,842	1,261
	,960	10,057	7,282	20,145	1,002	,862	1,304
	,970	10,840	7,705	22,764	1,035	,887	1,357
	,980	11,976	8,301	26,795	1,078	,919	1,428
CL99	,990	14,013	9,328	34,678	1,147	,970	1,540

a. É usado um fator de heterogeneidade.

b. Base de logaritmo = 10.

- Bti EstFx

Limites de confiança						
Probabilidade	Limites de confiança de 95% para ml/L			Limites de confiança de 95% para log(ml/L) ^b		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
PROBIT ^a ,010	1,734	1,057	2,276	,239	,024	,357
,020	1,924	1,224	2,467	,284	,088	,392
,030	2,055	1,344	2,597	,313	,128	,415
,040	2,159	1,442	2,700	,334	,159	,431
,050	2,248	1,526	2,786	,352	,184	,445
,060	2,327	1,602	2,862	,367	,205	,457
,070	2,398	1,671	2,930	,380	,223	,467
,080	2,463	1,736	2,993	,391	,240	,476
,090	2,524	1,797	3,051	,402	,255	,484
,100	2,582	1,855	3,106	,412	,268	,492
,150	2,834	2,115	3,343	,452	,325	,524
,200	3,052	2,347	3,547	,485	,370	,550
,250	3,253	2,564	3,732	,512	,409	,572
,300	3,444	2,776	3,908	,537	,443	,592
,350	3,632	2,987	4,081	,560	,475	,611
,400	3,819	3,199	4,254	,582	,505	,629
,450	4,009	3,418	4,431	,603	,534	,646
CL50 ,500	4,205	3,644	4,616	,624	,562	,664
,550	4,411	3,881	4,814	,645	,589	,682
,600	4,631	4,133	5,030	,666	,616	,702
,650	4,870	4,401	5,275	,688	,644	,722
,700	5,135	4,689	5,561	,711	,671	,745
,750	5,437	5,003	5,909	,735	,699	,772
,800	5,794	5,351	6,353	,763	,728	,803
,850	6,240	5,753	6,954	,795	,760	,842
,900	6,850	6,261	7,844	,836	,797	,895
,910	7,007	6,385	8,082	,846	,805	,907
,920	7,180	6,521	8,350	,856	,814	,922
,930	7,376	6,672	8,658	,868	,824	,937
,940	7,601	6,843	9,018	,881	,835	,955
,950	7,867	7,041	9,450	,896	,848	,975
,960	8,190	7,278	9,988	,913	,862	,999
,970	8,606	7,578	10,695	,935	,880	1,029
,980	9,192	7,991	11,719	,963	,903	1,069
CL99 ,990	10,197	8,681	13,549	1,008	,939	1,132

a. É usado um fator de heterogeneidade.

b. Base de logaritmo = 10.

- **PPF EstRock**

Limites de confiança						
Probabilidade	Limites de confiança de 95% para PPF_mgL			Limites de confiança de 95% para log(PPF_mgL) ^b		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
PROBIT ^a ,010	,000007	,000000	,000015	-5,173	-7,285	-4,811
,020	,000008	,000000	,000017	-5,089	-6,985	-4,759
,030	,000009	,000000	,000019	-5,035	-6,795	-4,726
,040	,000010	,000000	,000020	-4,995	-6,653	-4,701
,050	,000011	,000000	,000021	-4,962	-6,537	-4,680
,060	,000012	,000000	,000022	-4,935	-6,438	-4,662
,070	,000012	,000000	,000023	-4,910	-6,352	-4,646
,080	,000013	,000001	,000023	-4,888	-6,275	-4,632
,090	,000014	,000001	,000024	-4,868	-6,205	-4,619
,100	,000014	,000001	,000025	-4,850	-6,141	-4,607
,150	,000017	,000001	,000028	-4,775	-5,876	-4,556
,200	,000019	,000002	,000031	-4,714	-5,667	-4,513
,250	,000022	,000003	,000034	-4,663	-5,490	-4,475
,300	,000024	,000005	,000037	-4,616	-5,333	-4,437
,350	,000027	,000006	,000040	-4,573	-5,191	-4,400
,400	,000029	,000009	,000044	-4,533	-5,061	-4,360
,450	,000032	,000012	,000048	-4,493	-4,939	-4,317
CIE50 ,500	,000035	,000015	,000054	-4,454	-4,827	-4,267
,550	,000038	,000019	,000062	-4,416	-4,724	-4,207
,600	,000042	,000023	,000073	-4,376	-4,633	-4,134
,650	,000046	,000028	,000090	-4,336	-4,553	-4,044
,700	,000051	,000033	,000116	-4,293	-4,483	-3,934
,750	,000057	,000038	,000158	-4,246	-4,423	-3,801
,800	,000064	,000043	,000229	-4,195	-4,367	-3,641
,850	,000073	,000049	,000359	-4,134	-4,312	-3,445
,900	,000087	,000056	,000647	-4,059	-4,251	-3,189
,910	,000091	,000058	,000747	-4,040	-4,237	-3,126
,920	,000095	,000060	,000875	-4,021	-4,223	-3,058
,930	,000100	,000062	,001041	-3,999	-4,207	-2,982
,940	,000106	,000065	,001266	-3,974	-4,190	-2,898
,950	,000113	,000067	,001583	-3,947	-4,171	-2,801
,960	,000122	,000071	,002060	-3,914	-4,149	-2,686
,970	,000134	,000076	,002852	-3,874	-4,122	-2,545
,980	,000151	,000082	,004401	-3,820	-4,087	-2,356
CIE99 ,990	,000184	,000093	,008744	-3,736	-4,034	-2,058

a. E usado um fator de heterogeneidade.

b. Base de logaritmo = 10.

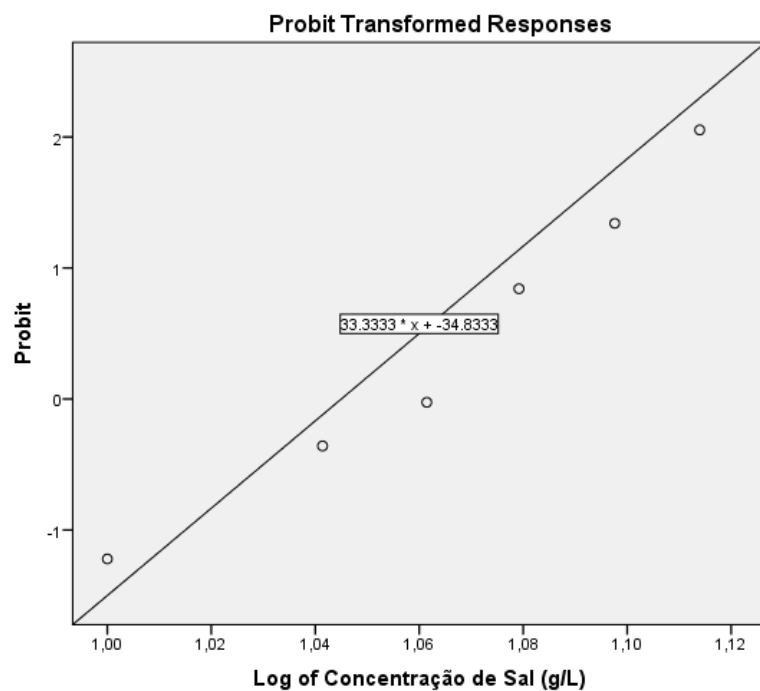
- PPF EstFx

Limites de confiança						
Probabilidade	Limites de confiança de 95% para PPF_mgL			Limites de confiança de 95% para log(PPF_mgL) ^a		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
PROBIT ,010	,000005	,000002	,000008	-5,331	-5,722	-5,103
,020	,000006	,000003	,000010	-5,198	-5,540	-4,997
,030	,000008	,000004	,000012	-5,113	-5,425	-4,929
,040	,000009	,000005	,000013	-5,049	-5,338	-4,878
,050	,000010	,000005	,000015	-4,997	-5,268	-4,836
,060	,000011	,000006	,000016	-4,953	-5,208	-4,801
,070	,000012	,000007	,000017	-4,914	-5,156	-4,770
,080	,000013	,000008	,000018	-4,879	-5,109	-4,742
,090	,000014	,000009	,000019	-4,848	-5,066	-4,716
,100	,000015	,000009	,000020	-4,819	-5,027	-4,693
,150	,000020	,000014	,000025	-4,698	-4,866	-4,594
,200	,000025	,000018	,000031	-4,603	-4,740	-4,515
,250	,000030	,000023	,000036	-4,521	-4,633	-4,444
,300	,000036	,000029	,000042	-4,447	-4,540	-4,379
,350	,000042	,000035	,000048	-4,379	-4,457	-4,315
,400	,000049	,000041	,000056	-4,314	-4,383	-4,249
,450	,000056	,000048	,000066	-4,251	-4,316	-4,181
CIE50 ,500	,000065	,000056	,000078	-4,190	-4,254	-4,110
,550	,000074	,000064	,000092	-4,128	-4,197	-4,035
,600	,000086	,000072	,000111	-4,066	-4,141	-3,955
,650	,000100	,000082	,000134	-4,001	-4,085	-3,872
,700	,000117	,000094	,000165	-3,933	-4,027	-3,782
,750	,000138	,000108	,000207	-3,859	-3,967	-3,684
,800	,000167	,000126	,000266	-3,777	-3,899	-3,575
,850	,000208	,000151	,000358	-3,681	-3,822	-3,446
,900	,000275	,000188	,000521	-3,561	-3,725	-3,283
,910	,000294	,000199	,000570	-3,532	-3,702	-3,244
,920	,000316	,000210	,000629	-3,500	-3,677	-3,201
,930	,000342	,000224	,000701	-3,466	-3,649	-3,154
,940	,000374	,000241	,000792	-3,427	-3,618	-3,101
,950	,000414	,000261	,000909	-3,383	-3,583	-3,041
,960	,000467	,000287	,001069	-3,331	-3,542	-2,971
,970	,000541	,000323	,001306	-3,267	-3,491	-2,884
,980	,000657	,000377	,001704	-3,182	-3,423	-2,768
CIE99 ,990	,000895	,000482	,002593	-3,048	-3,317	-2,586

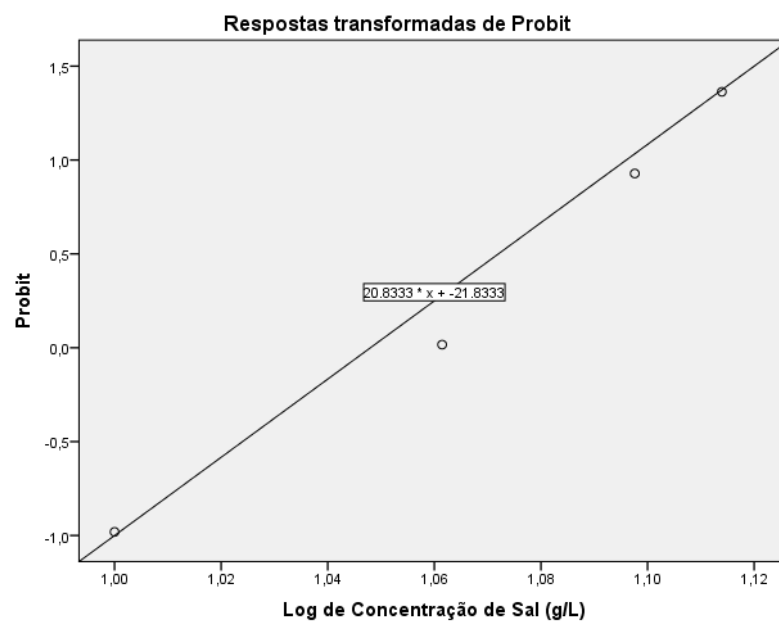
a. Base de logaritmo = 10.

Gráfico dose vs mortalidade obtidos nos ensaios de dose resposta OMS, transformados em *Probit*, e respetiva equação de reta, organizados por produto testado.

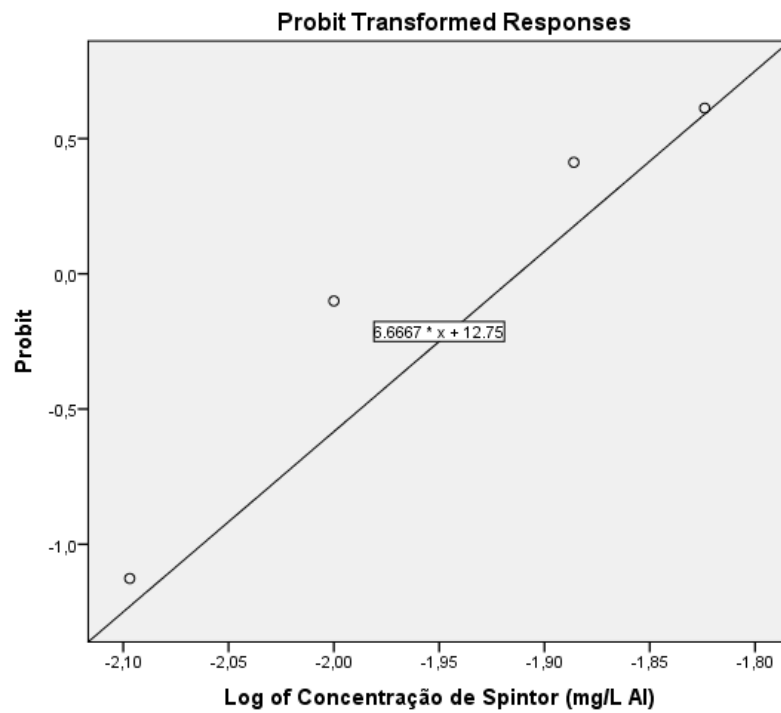
- **SAL EstRock**



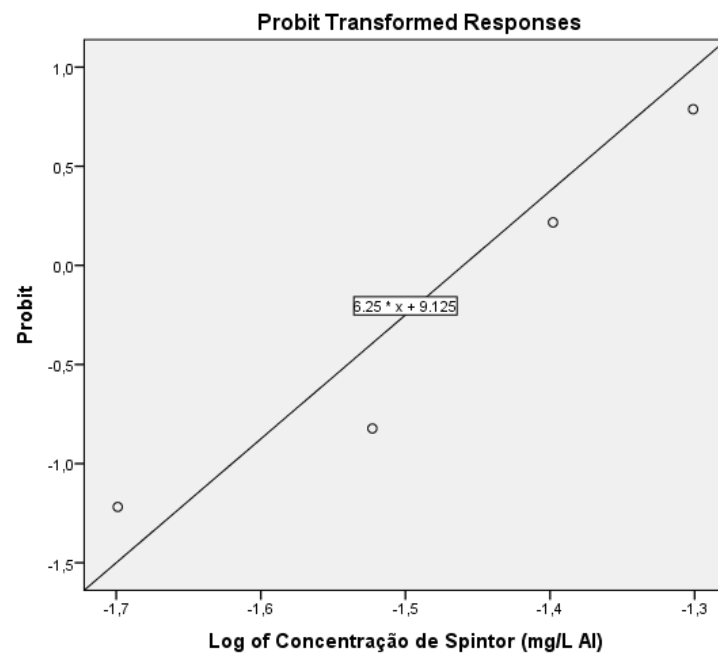
- **SAL EstFx**



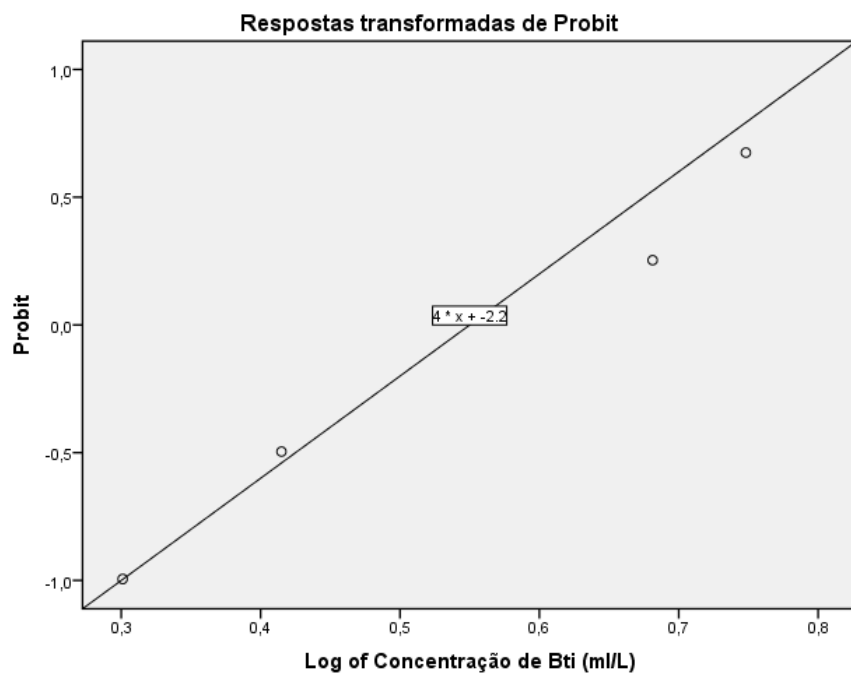
- **ESPINOSADE EstRock**



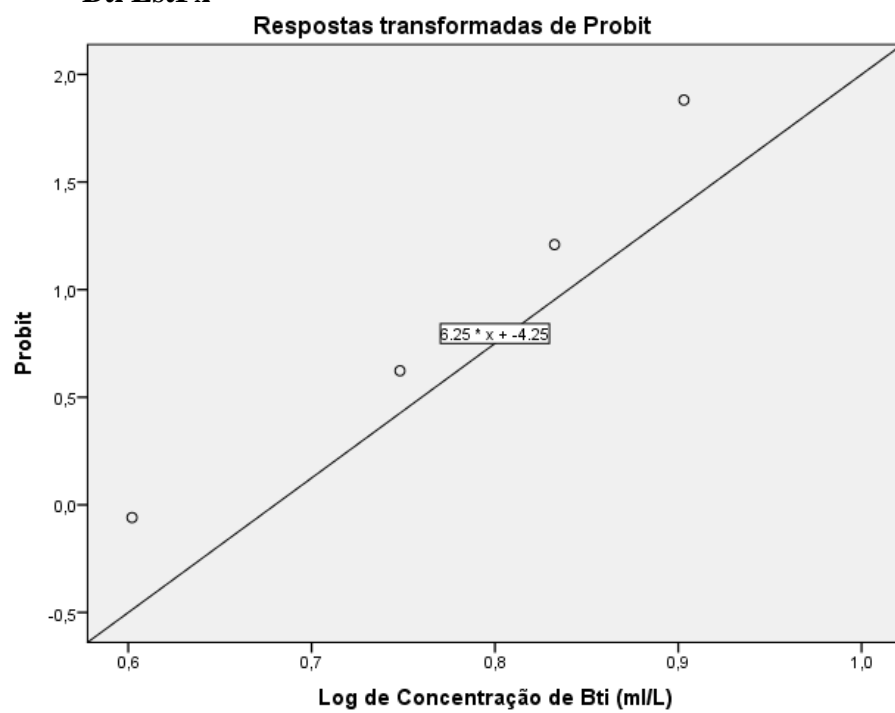
- **ESPINOSADE EstFx**



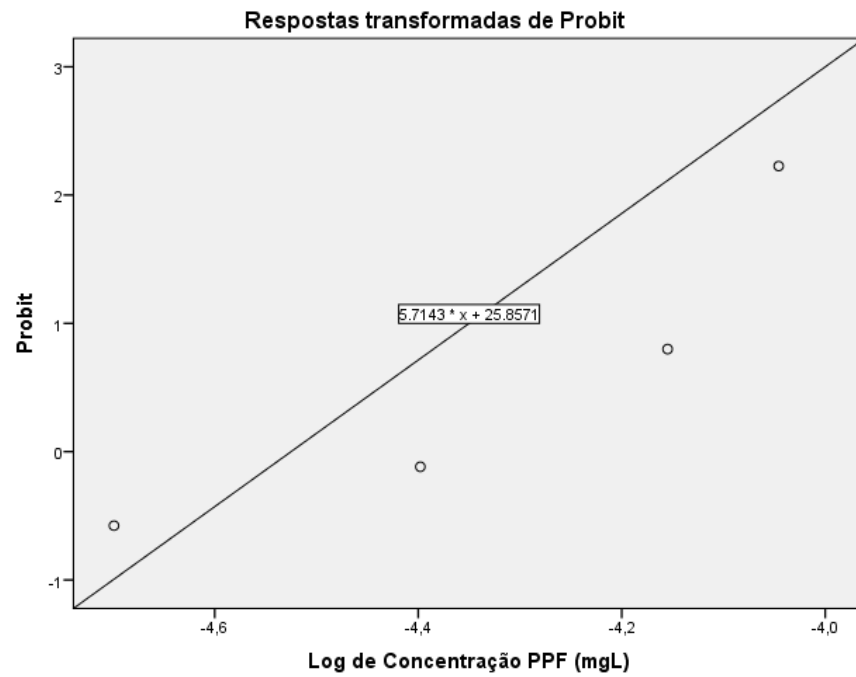
- **Bti EstRock**



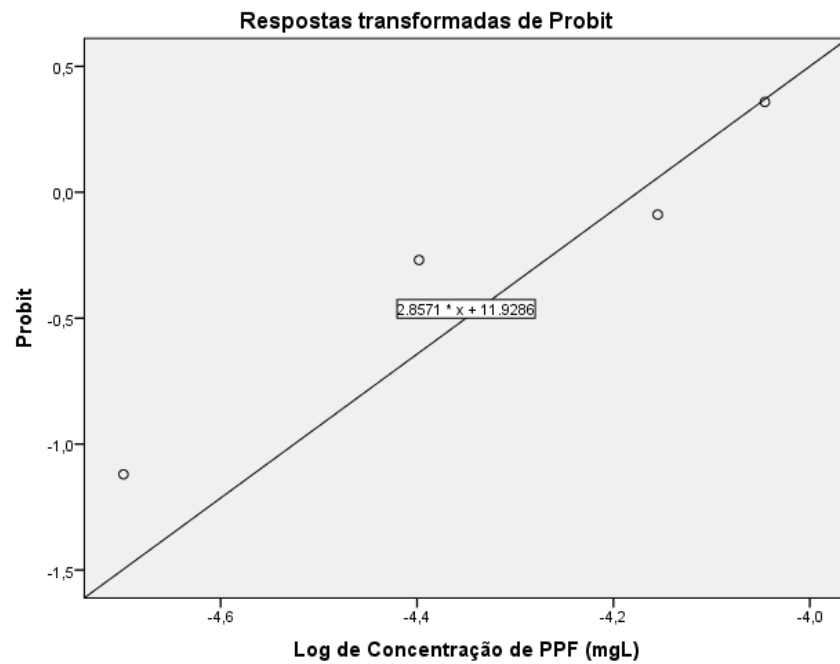
- **Bti EstFx**



- **PFF EstRock**



- **PFF EstFx**



Anexo 2: Análises estatísticas dos estudos de oviposição

- **Sal sem papel de filtro**

a) Teste de Normalidade

Teste Normalidade^b

Tipo de tratamento/Observação		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Ovos por fêmea	Água (controle) às 24h	,307	3	.	,903	3	,397
	Sal às 24h	,372	3	.	,781	3	,071
	Água (controle) às 48h	,327	3	.	,871	3	,299

a. Lilliefors Significance Correction

b. Ovos por fêmea é constante quando Tipo de tratamento/Observação = Sal às 48h. Foi omitido.

b) Teste T às 24h: água (controle) vs sal 16g/L

Estatísticas de grupo

Tipo de tratamento/Observação		N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Ovos por fêmea	Água (controle) às 24h	3	10,1559	5,14045	2,96784
	Sal às 24h	3	,7901	1,22181	,70541

Teste de amostras independentes

			Ovos por fêmea	
			Variações iguais assumidas	Variações iguais não assumidas
Teste de Levene para igualdade de variações	F		6,287	
	Sig.		,066	
	t		3,070	3,070
	df		4	2,225
teste t para Igualdade de Médias	Sig. (2 extremidades)		,037	,080
	Diferença média		9,36580	9,36580
	Erro padrão de diferença		3,05052	3,05052
	95% Intervalo de	Inferior	,89619	-2,56503
	confiança da diferença	Superior	17,83541	21,29663

- **Sal com papel de filtro**

a) Teste de Normalidade

Teste Normalidade							
Tipo de tratamento/Observação		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Ovos por fêmea	Água (controle) 24 horas	,211	6	,200*	,916	6	,479
	Sal 16g/L 24 horas	,395	6	,004	,571	6	,000
	Água (controle) 48 horas	,161	6	,200*	,979	6	,949
	Sal 16g/L 48 horas	,492	6	,000	,496	6	,000

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

b) Teste de homogeneidade das variâncias

Teste de homogeneidade das variâncias					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ovos por fêmea	Com base em média	11,941	3	20	,000
	Com base em mediana	11,400	3	20	,000
	Com base em mediana e com df ajustado	11,400	3	12,755	,001
	Com base em média cortada	11,961	3	20	,000

c) Teste não paramétrico Mann-Whitney-U às 24h: água (controle) vs sal 16g/L

Classificações				
Tipo de tratamento/Observação		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ovos por fêmea	Água (controle) 24 horas	6	9,25	55,50
	Sal 16g/L 24 horas	6	3,75	22,50
	Total	12		

Test Statistics ^a	
	Ovos por fêmea
Mann-Whitney U	1,500
Wilcoxon W	22,500
Z	-2,694
Sig. Assint. (2 caudas)	,007
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,004 ^b

a. Variável de agrupamento: Tipo de tratamento/Observação

b. Não corrigido para vínculos.

d) Teste não paramétrico Mann-Whitney-U às 48h: água (controle) vs sal às 16g/L

Classificações

Tipo de tratamento/Observação		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ovos por fêmea	Água (controle) 48 horas	6	8,75	52,50
	Sal 16g/L 48 horas	6	4,25	25,50
	Total	12		

Test Statistics^a

	Ovos por fêmea
Mann-Whitney U	4,500
Wilcoxon W	25,500
Z	-2,308
Sig. Assint. (2 caudas)	,021
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,026 ^b

a. Variável de agrupamento: Tipo de tratamento/Observação

b. Não corrigido para vínculos.

- **Espinosade**

a) Teste da Normalidade

Teste de Normalidade

Tipo de Tratamento/Observação		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Ovos por fêmea	Água (controle) 24 horas	,299	6	,101	,832	6	,113
	Espinosade 0,1mg/L (IA) 24 horas	,187	6	,200*	,983	6	,967
	Espinosade 0,5mg/L (IA) 24 horas	,276	6	,171	,889	6	,315
	Água (controle) 48 horas	,244	6	,200*	,851	6	,162
	Espinosade 0,1mg/L (IA) 48 horas	,224	6	,200*	,936	6	,624
	Espinosade 0,5mg/L (IA) 48 horas	,264	6	,200*	,866	6	,210

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

b) Teste de homogeneidade das variâncias

Teste de homogeneidade das variâncias

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ovos por fêmea	Com base em média	2,245	5	30	,075
	Com base em mediana	1,365	5	30	,265
	Com base em mediana e com df ajustado	1,365	5	22,259	,275
	Com base em média cortada	2,163	5	30	,085

c) Teste paramétrico ANOVA um fator às 24 horas: água (controle) vs espinosade 0,1mg/L vs espinosade 0,5mg/L

ANOVA

Ovos por fêmea

	Soma dos Quadrados	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
Entre Grupos	,351	2	,175	,294	,750
Nos grupos	8,949	15	,597		
Total	9,300	17			

d) Teste paramétrico ANOVA um fator às 48 horas: água (controle) vs espinosade 0,1mg/L vs espinosade 0,5mg/L

ANOVA

Ovos por fêmea

	Soma dos Quadrados	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
Entre Grupos	2,606	2	1,303	1,169	,338
Nos grupos	16,726	15	1,115		
Total	19,333	17			

- **Bti**

a) Teste da Normalidade

Teste da Normalidade

Tipo de tratamento / Observação		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Ovos por fêmea	Água (Controlo) às 24h	,385	3	.	,750	3	,000
	Bti às 24h	,385	3	.	,750	3	,000
	Água (Controlo) às 48h	,366	3	.	,795	3	,103
	Bti às 48h	,204	3	.	,993	3	,843
	Água (Controlo) às 72h	,378	3	.	,768	3	,039
	Bti às 72h	,328	3	.	,871	3	,298

a. Lilliefors Significance Correction

b) Teste não paramétrico Mann-Whitney-U às 24h: água (controlo) vs Bti 12ml/L

Classificações

Tipo de tratamento / Observação		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ovos por fêmea	Água (Controlo) às 24h	3	3,67	11,00
	Bti às 24h	3	3,33	10,00
	Total	6		

Test Statistics^a

	Ovos por fêmea
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-,258
Sig. Assint. (2 caudas)	,796
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	1,000 ^b

a. Variável de agrupamento: Tipo de tratamento / Observação

b. Não corrigido para vínculos.

c) Teste T às 48h: água (controlo) vs Bti 12ml/L

Estatísticas de grupo

Tipo de tratamento / Observação		N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Ovos por fêmea	Água (Controlo) às 48h	3	,65667	,930878	,537443
	Bti às 48h	3	1,46667	1,404754	,811035

Teste de amostras independentes

			Ovos por fêmea	
			Variações iguais assumidas	Variações iguais não assumidas
Teste de Levene para igualdade de variações	F		,323	
	Sig.		,600	
	t		-,833	-,833
	df		4	3,473
teste t para Igualdade de Médias	Sig. (2 extremidades)		,452	,459
	Diferença média		-,810000	-,810000
	Erro padrão de diferença		,972945	,972945
	95% Intervalo de confiança da diferença	Inferior	-3,511329	-3,681106
		Superior	1,891329	2,061106

d) Teste não paramétrico Mann-Whitney-U às 72h: água (controlo) vs Bti 12ml/L

Classificações

Tipo de tratamento / Observação		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ovos por fêmea	Água (Controlo) às 72h	3	4,67	14,00
	Bti às 72h	3	2,33	7,00
	Total	6		

Test Statistics^a

	Ovos por fêmea
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	7,000
Z	-1,528
Sig. Assint. (2 caudas)	,127
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,200 ^b

a. Variável de agrupamento: Tipo de tratamento / Observação

b. Não corrigido para vínculos.

- **Piriproxifeno**

a) Teste de Normalidade

Teste de Normalidade

Tipo de tratamento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Água (Controlo) às 24h	,214	6	,200*	,885	6	,293
PPF às 24h	,228	6	,200*	,865	6	,207
Água (Controlo) às 48h	,340	6	,029	,781	6	,040
PPF às 48h	,153	6	,200*	,950	6	,743

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Lilliefors Significance Correction

b) Teste de homogeneidade das variâncias

Teste de homogeneidade das variâncias

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Com base em média	1,143	3	20	,356
Com base em mediana	,310	3	20	,818
Com base em mediana e com df ajustado	,310	3	12,294	,818
Com base em média cortada	,984	3	20	,420

c) Teste T às 24h: água (controlo) vs PPF 0,01mg/L

Estatísticas de grupo

Tipo de tratamento	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
Água (Controlo) às 24h	6	3,23166	1,228626	,501584
PPF às 24h	6	2,88412	1,955021	,798134

Teste de amostras independentes

		Ovos por fêmea	
		Variações iguais assumidas	Variações iguais não assumidas
Teste de Levene para igualdade de variações	F	2,058	
	Sig.	,182	
	t	,369	,369
	df	10	8,417
teste t para Igualdade de Médias	Sig. (2 extremidades)	,720	,721
	Diferença média	,347540	,347540
	Erro padrão de diferença	,942658	,942658
	95% Intervalo de confiança da diferença	Inferior -1,752834	-1,807650
		Superior 2,447914	2,502730

d) Teste não paramétrico Mann-Whitney-U às 48h: água (controle) vs PPF 0,01mg/L

Classificações

Tipo de tratamento / Observação		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ovos por fêmea	Água (Controle) às 48h	6	6,00	36,00
	PPF às 48h	6	7,00	42,00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Ovos por fêmea
Mann-Whitney U	15,000
Wilcoxon W	36,000
Z	-,480
Sig. Assint. (2 caudas)	,631
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,699 ^b

a. Variável de agrupamento: Tipo de tratamento / Observação

b. Não corrigido para vínculos.